

Evaluación de un recubrimiento sol-gel biodegradable cargado con antifúngicos para la prevención y el tratamiento de infecciones protésicas producidas por especies del género *Candida*

Tesis doctoral presentada por: **David Romera García**

Para optar al título de doctor en microbiología

Madrid, 2019

Universidad autónoma de Madrid

Facultad de ciencias

Director y tutor: Jaime Esteban Moreno



D. Jaime Esteban Moreno, doctor en medicina y cirugía, facultativo especialista en Microbiología y parasitología clínica y doctor en medicina por la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA QUE

D. David Romera García, licenciado en bioquímica y posgraduado en biofísica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha completado bajo su dirección los estudios conducentes a la obtención del título de DOCTOR por la Universidad Autónoma de Madrid. Y en vista de lo adecuado de su desarrollo, autoriza la presentación de esta Tesis Doctoral para su evaluación.

Y para que conste, se firma en Madrid, a 20 de octubre de 2019.

Fdo.: Jaime Esteban Moreno

Agradecimientos

Cuando se me pasó la conmoción causada por la notificación de que me habían concedido una prestigiosa beca para hacer el doctorado en la FJD, hice lo que a cualquier persona sensata se le ocurriría hacer: organizar una fiesta con setecientas personas para honrar tal acontecimiento y buscar un tutorial online para ver cómo se hace una tesis.

El tutorial elegido finalmente fue el de wikihow (<https://es.wikihow.com/escribir-una-tesis>), que explica en 8 cómodos y sencillos pasos cómo realizar un doctorado. Pues bien, casi tres años después puedo afirmar que funciona a la perfección. Por fin he escrito la tesis y voy a volver a ver la luz del sol. Y por ello quiero agradecer a todas aquellas personas que han contribuido a hacer esto posible, ya que desde hace unos años numerosos blogs de bienestar reportan los grandes beneficios de la luz solar. En serio, gracias a todos.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director y tutor de tesis, Jaime Esteban, por su dedicación, sentido práctico y saber hacer, y también a Ricardo Fernández e Ignacio Gadea, que sin ser directamente tutores me han ayudado con sus consejos y enseñanzas. Quiero destacar, además, el buen sentido del humor de los tres, que ayudaba a mejorar el ambiente de trabajo.

Además, quiero agradecer a la Fundación Conchita Rábago por concederme la beca predoctoral de investigación Jiménez Díaz, y a la Fundación Mutua Madrileña por la concesión del proyecto de investigación en el que se ha enmarcado la tesis. A Amaya, Betty y Toñi por trabajar codo con codo en el proyecto, y al Dr. Julio García Sandoval, por suministrarnos las cepas de *C. auris*.

Por otra parte, esta tesis no es solo lo que contiene el manuscrito, si no que ha habido varias colaboraciones que también han contribuido a mi formación. Gracias al grupo de investigación del Dr. Miguel Manso Silván (UAM), al grupo del Dr. Pío González (Universidad de Vigo) y al grupo de la Dra. María Luz Sánchez Silva (Universidad de Castilla-La Mancha) por dejarme tomar parte en ellas. También quiero hacer una mención especial a la labor de Alexandra Elbakyan, creadora del sitio web Sci-hub, que

proporciona acceso ilimitado a casi todos los artículos publicados y permite que la ciencia sea accesible para los investigadores de cualquier parte del mundo.

En segundo lugar, quiero agradecer a mis compañeros de trabajo. A los técnicos de laboratorio de la Fundación Jiménez Díaz por su gran compañerismo y por los buenos ratos pasados, que, aunque no fueran muchos, los conservo con cariño. A Curra, por sus enseñanzas de vida y de microscopía confocal (y porque como no la ponga aquí me mata). A Moncho, por abrirme los ojos y mostrarme que Led Zeppelin es un grupo de aficionados al lado de grupos como OBK, o Taburete. A Ana, Marta, Chela, Alicia, Llanos y la nueva Marta por su ayuda, su amistad, y los buenos momentos pasados tanto dentro como fuera del laboratorio. A los ~~siete~~ estudiantes de doctorado, encarnados todos en John Jairo Aguilera-Correa, por muchas cosas. Realmente no habría acabado esta tesis de no ser por las enormes dosis de paciencia y la inestimable ayuda que John desde el primer día me prestó, comportándose como compañero y como amigo¹.

-Hijo, ¿tú qué es lo que estudiabas? Porque le he dicho a mi amiga que algo de química en un hospital-. Pues eso, a mi familia, por estar siempre ahí intentando entender mis inquietudes y compartiendo mis frustraciones y mis logros con la investigación. A mis tíos, primos y abuelos por perdonarme el no haber podido ir a alguna de las 74 reuniones que se organizan cada año y darme ánimos en todo momento. A Patri, por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo el recorrido, dándome confianza y cariño.

A los colegas de toda la vida y de la universidad, a la vieja y la nueva guardia de Imdea Nanociencia y a todos mis compañeros de tatami. A ellos les debo esos momentos de disfrute y desconexión tan imprescindibles durante esta etapa.

A todos vosotros, gracias.

¹Durante todas sus horas de dedicación a la investigación, John también ha sido psicólogo, experto en moda, marchante de arte, crítico de la revista *Nature*, estilista, decorador de interiores, profesor, detective, tesorero y un largo etcétera.

Índice de contenidos

RESUMEN	1
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. EL GÉNERO <i>CANDIDA</i>	9
1.2. PARED CELULAR EN <i>CANDIDA</i>	9
1.2.1. <i>Implicaciones en la resistencia a agentes antimicrobianos</i>	11
1.3. EPIDEMIOLOGÍA Y PATOGENIA	12
1.3.1. <i>Una nueva especie de Candida no-albicans: Candida auris</i>	15
1.4. FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN DISPOSITIVOS MÉDICOS	17
1.4.1. <i>Mecanismos de formación de biopelículas sobre biomateriales</i>	18
1.4.2. <i>Regulación de la formación de biopelículas</i>	23
1.5. INFECCIÓN DE PRÓTESIS POR <i>CANDIDA</i>	24
1.5.1 <i>Nuevos biomateriales para la prevención y el tratamiento de la infección protésica causada por hongos</i>	27
2. HIPÓTESIS	29
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1. IDENTIFICACIÓN, SELECCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS UTILIZADAS.	31
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS	32
4.2.1. <i>Determinación de la producción de biopelículas y caracterización de su estructura mediante microscopía confocal</i>	32
4.2.2. <i>Cuantificación de la biomasa viable producida por las biopelículas</i>	34
4.2.3. <i>Modelo in vivo de infección de Candida auris en Galleria mellonella</i>	35
4.2.4. <i>Estudio de susceptibilidad a antifúngicos (1): determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)</i>	37
4.2.5. <i>Estudio de susceptibilidad a antifúngicos (2): determinación de la concentración mínima de erradicación de la biopelícula (CMEB)</i>	¡Error! Marcador no definido.
4.2.6. <i>Caracterización del tratamiento de las biopelículas de C. auris con antifúngicos mediante microscopía confocal</i>	40
4.3. DISEÑO Y EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA Y CELULAR DE UN RECUBRIMIENTO SOL-GEL BIODEGRADABLE CARGADO CON ANTIFÚNGICOS.	42
4.3.1. <i>Fabricación y caracterización del sol-gel cargado con fluconazol o anidulafungina.</i>	42
4.3.2. <i>Estudio de la adherencia de levaduras al sol-gel</i>	43
4.3.3. <i>Estudio de prevención de la formación de biopelículas sobre piezas de Titanio recubiertas con sol-gel cargado con fluconazol y anidulafungina</i>	43

4.3.4. Estudio del tratamiento de biopelículas con el sol-gel cargado con fluconazol o anidulafungina mediante el método de Calgary.....	44
4.3.5. Evaluación celular del sol-gel.....	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD ..	47
5.1.1. Evaluación de la producción de biopelículas mediante microscopía confocal..	47
5.1.2. Cuantificación de la biomasa viable producida por las biopelículas	52
5.1.3. Modelo in vivo de infección en <i>Galleria mellonella</i>	53
5.1.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima de erradicación de la biopelícula (CMEB).....	56
5.1.5. Caracterización del tratamiento de las biopelículas de <i>C. auris</i> con antifúngicos conocidos mediante microscopía confocal	57
5.2. EVALUACIÓN DEL SOL-GEL CARGADO CON ANTIFÚNGICOS	59
5.2.1. Estudio de adherencia de las levaduras al recubrimiento sol-gel	59
5.2.2. Estudio de prevención de la formación de biopelículas sobre piezas de Titanio recubiertas con el sol-gel cargado con antifúngicos	60
5.2.3. Evaluación del tratamiento de biopelículas con los recubrimientos cargados con antifúngicos	63
5.2.4. Evaluación de la citotoxicidad y proliferación en células de mamífero a la exposición del recubrimiento sol-gel.....	65
6. DISCUSIÓN	66
6.1. FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y PATOGENICIDAD.....	66
6.1.1. Análisis de la formación de biopelículas.....	66
6.1.2. Modelo in vivo de infección de <i>C. auris</i> en <i>G. mellonella</i>	69
6.1.3. Susceptibilidad a antifúngicos en <i>C. auris</i>	71
6.1.4. Tratamiento de biopelículas de <i>C. auris</i> con antifúngicos mediante microscopía confocal.....	73
6.2. EVALUACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS	76
7. CONCLUSIONES	80
8. BIBLIOGRAFÍA.....	82
9. ANEXOS	95
9.1. ANEXO I: PROGRAMACIÓN. DISEÑO DE UNA MACRO PARA EL ANÁLISIS AUTOMÁTICO DE IMÁGENES DE MICROSCOPIA CONFOCAL USANDO EL SOFTWARE [IMAGE].....	96
9.2. ANEXO II: PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES EN CONGRESOS RELACIONADAS CON LA TESIS..	98
9.3. ANEXO III: BECAS	103

Resumen

El reemplazo articular es un procedimiento que mejora la vida de millones de personas al año, proporcionando alivio del dolor, restableciendo la función articular y aportando independencia. En los próximos veinte años se espera que el número de artroplastias aumente en más de un 150%, lo que traerá consigo un aumento de las complicaciones asociadas, como el aflojamiento, lesiones vasculares, inestabilidad, mala cicatrización de la herida quirúrgica, o infecciones.

Las infecciones de prótesis articulares, aunque infrecuentes, suponen una condición devastadora para el paciente y un alto coste para el sistema sanitario. La mayoría están causadas por bacterias y un 1-2% están causadas por hongos, entre los que destacan algunas especies del género *Candida*. Actualmente, existe gran cantidad de literatura relacionada con las primeras, con guías terapéuticas disponibles para el manejo y tratamiento de los pacientes. En cambio, debido a la baja frecuencia, las distintas características clínicas de los pacientes y la gran variabilidad con que se manifiestan las infecciones protésicas causadas por hongos actualmente no hay guías terapéuticas estandarizadas para estas infecciones, y en muchos casos el tratamiento depende de la experiencia de cada centro. Estas infecciones se caracterizan por el desarrollo de una biopelícula fúngica sobre la superficie del implante, la cual protege al hongo de los tratamientos y la reacción del sistema inmune. Además, contribuye a dañar el tejido periprotésico y puede ocasionar una infección sistémica. Las biopelículas producidas por hongos son especialmente resistentes y resilientes al tratamiento, lo que ocasiona con frecuencia reinfecciones y fallos terapéuticos, por lo que suele ser necesaria una terapia prolongada con antifúngicos y sucesivas intervenciones para desinfectar la zona y efectuar un recambio del implante.

Para lidiar con el desafío que presentan estas infecciones se han abordado tres estrategias complementarias en la literatura. La primera se enfoca en promover la osteointegración del material, lo que minimiza la posibilidad de desarrollar una infección. La segunda se basa en la modificación de la superficie del biomaterial para reducir la adherencia de microorganismos, el paso previo al desarrollo de una

biopelícula. La tercera está enfocada al desarrollo de sistemas eficientes de liberación de antifúngicos que permitan prevenir y tratar localmente estas infecciones.

El objetivo principal de esta tesis es la evaluación *in vitro* de un recubrimiento híbrido organo-inorgánico de tipo sol-gel, biofuncionalizado con organofosfito y cargado con fluconazol o anidulafungina para prevenir y tratar infecciones protésicas causadas por *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*, las especies de hongo aisladas con mayor frecuencia. La consecución de este objetivo pasa por dos fases: la caracterización previa de las cepas y la evaluación del recubrimiento. En la primera fase se incluye además la caracterización de varias cepas del hongo *Candida auris*, debido a que en los primeros meses de esta tesis se tuvo acceso a ellas, y se comparan los resultados con los obtenidos en las otras dos especies. La importancia clínica de *C. auris* no ha dejado de crecer desde que se descubrió en 2009 debido a su gran capacidad de colonización y transmisión inter e intrahospitalaria y las múltiples resistencias a antifúngicos que presentan los aislados clínicos. Estas características han posicionado al patógeno como uno de los agentes etiológicos de mayor importancia en infección sistémica de origen nosocomial causada por hongos en la actualidad.

En todas las cepas se caracterizó la capacidad de formación de biopelículas mediante microscopía confocal y espectroscopía de fluorescencia. Además, en las cepas de *C. auris* se caracterizó su patogenicidad usando un modelo *in vivo* de infección en *Galleria mellonella*, se evaluó su susceptibilidad a antifúngicos en estado planctónico y sésil y se estudió el efecto del tratamiento con antifúngicos de las biopelículas mediante microscopía confocal. Los resultados obtenidos en *C. auris* se compararon con los obtenidos en *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

En la segunda fase, se evaluó la adherencia de las cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* a los recubrimientos sin adición de antifúngico, y se con los recubrimientos cargados con antifúngicos se estudió la capacidad de prevención de la formación de biopelículas y su uso como tratamiento de biopelículas maduras de ambas especies. Finalmente, se realizó un estudio de citotoxicidad en células de mamífero.

Los resultados obtenidos en todos los experimentos revelaron el distinto comportamiento de las cepas clínicas respecto a las cepas de referencia en las tres especies: produjeron biopelículas más abundantes, fueron más patogénicas y presentaron distintos patrones de susceptibilidad.

Los resultados de caracterización indicaron que todas las cepas estudiadas tuvieron la capacidad de formar una biopelícula madura, variando las características de éstas en función de la especie estudiada y las condiciones de crecimiento. Por ejemplo, *C. albicans* produjo las biopelículas más abundantes y complejas, compuestas de levaduras y elementos filamentosos embebidos en abundante matriz extracelular, mientras que *C. auris* produjo las biopelículas menos abundantes, compuestas principalmente por densos grupos de levaduras.

Los resultados del modelo *in vivo* en *G. mellonella* indicaron que las cepas de *C. albicans* fueron más patogénicas que las de *C. auris*, y que el fenotipo de las cepas de *C. auris* produjo una respuesta diferencial en el modelo.

Los estudios de sensibilidad a antifúngicos revelaron que las cepas de *C. auris* presentaron una mayor tolerancia a los antifúngicos en comparación con las cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis*. Además, las biopelículas producidas por las tres especies fueron mucho más resistentes que las levaduras en estado planctónico, y además las producidas por los aislados clínicos de *C. auris* fueron resistentes a todos los antifúngicos estudiados.

Finalmente, el tratamiento con antifúngicos de las biopelículas de *C. auris* redujo significativamente su viabilidad y su superficie cubierta, siendo la anidulafungina el antifúngico más efectivo.

La caracterización de los recubrimientos sin carga de antifúngico indicó que éstos disminuyeron la adherencia de *C. albicans*, pero aumentaron hasta en 65 veces la de *C. parapsilosis*. Los recubrimientos cargados con anidulafungina fueron más eficaces previniendo la formación de biopelículas de *C. albicans*, y los cargados con fluconazol lo fueron en la prevención de la formación de biopelículas de *C. parapsilosis*. Los experimentos de tratamiento con los recubrimientos demostraron que la presencia del recubrimiento sin antifúngicos fue suficiente para reducir las biopelículas formadas por

C. albicans, y la carga con fluconazol o anidulafungina aumentó ligeramente este efecto. En las cepas de *C. parapsilosis*, la presencia del recubrimiento estimuló la formación de biopelículas, y la carga con fluconazol las redujo hasta en un 99%. Por último, no se observaron eventos de citotoxicidad debidos a la presencia de antifúngicos en sol-gel.

Un biomaterial exitoso con aplicaciones reales en medicina abordaría estas características: ser no citotóxico y mínimamente invasivo, promover la osteointegración y prevenir y/o combatir eficazmente las infecciones microbianas. En esta tesis se ha caracterizado un novedoso recubrimiento híbrido organo-inorgánico de tipo sol-gel que puede fabricarse fácilmente y aplicarse directamente a la superficie del implante. El sol-gel se biodegrada en las primeras 24-48 horas posteriores a la intervención, el período crítico para el desarrollo de una infección. Esta biodegradación permite la liberación de compuestos de fósforo y antifúngicos en la zona, promoviendo la osteointegración y evitando la formación de biopelículas fúngicas, presentando este recubrimiento como una herramienta prometedora para reducir la incidencia de infecciones protésicas causadas por hongos.

Abstract

Joint replacement is a procedure that improves the life of millions of people every year, providing pain relief, independence and restoring joint function. It is expected that the number of arthroplasties will increase by more than 150% in the next twenty years, which consequently will lead to an increase in the associated complications, such as loosening, vascular injuries, instability, poor surgical wound healing or infections.

Prosthetic joint infections, despite being infrequent, represent a devastating condition for the patient and entail elevated costs for the healthcare system. The majority of these infections are caused by bacteria and 1-2% are caused by fungi, being *Candida* species the most frequently isolated.

There currently exist large amounts of literature describing bacterial prosthetic joint infections and therapeutic guidelines are available for patient management and treatment. In contrast, standardized therapeutic guidelines are not available for fungal prosthetic joint infections mainly due to their low frequency, the different clinical characteristics of the patients and the high variability of presentation, and the treatment often depends on the experience of each center. These infections are characterized by the development of a fungal biofilm on the implant surface that protects the fungus from the treatment and the immune system reaction, damages the periprosthetic tissue and can cause a systemic infection. Fungal biofilms are especially resistant and resilient to treatment, which often leads to reinfections and therapeutic failure, so prolonged antifungal therapy and repeated interventions are often necessary to disinfect the area and perform a joint replacement.

To deal with the challenge of these infections, three complementary strategies have been addressed in the literature. The first focuses on promoting osseointegration of the implant, which minimizes the possibility of developing an infection. Second is based on surface modification of the biomaterial to reduce the adhesion of microorganisms, which is the previous step for biofilm development. Third strategy is focused on the development of efficient local drug delivery systems to prevent and treat these infections.

The main objective of this thesis is the *in vitro* evaluation of a hybrid organo-inorganic sol-gel coating, biofunctionalized with organophosphite and loaded with fluconazole or anidulafungin to prevent and treat fungal prosthetic infections caused by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*, the most frequently isolated species. This objective will be achieved through two phases: the previous characterization of the strains and the evaluation of the coatings. In the first phase, the results from these species are compared to those obtained from the characterization of few *Candida auris* strains, as we had access to them within the first months of this thesis. The clinical importance of *C. auris* has increased rapidly since it was discovered in 2009 due to its high colonization and transmission capacities in and between healthcare centers all around the world and the antifungal resistance displayed by clinical isolates. These characteristics have positioned this pathogen as one of the main fungal etiological agents causing nosocomial systemic infections.

First, biofilm production was characterized in all strains using confocal microscopy and fluorescence spectroscopy. Characterization of *C. auris* strains included an *in vivo* infection model in *Galleria mellonella*, the evaluation of their planktonic and biofilm antifungal susceptibility and the evaluation of the antifungal treatment of biofilms using confocal microscopy. Results obtained with *C. auris* strains were compared with those obtained with *C. albicans* and *C. parapsilosis* strains.

In the second phase, the adherence of *C. albicans* and *C. parapsilosis* strains to the coatings without addition of antifungals was evaluated. Then, prevention of biofilm formation and biofilm treatment were studied using the antifungal-loaded coatings. Finally, a cytotoxicity assay using mammalian cells was performed.

Results obtained in all the experiments revealed the different behavior of clinical strains compared to reference strains in the three species: they produced more abundant biofilms, were more pathogenic and presented different susceptibility patterns.

Characterization studies showed that all strains had the ability to form a mature biofilm, varying their characteristics depending on the species and growth conditions. As example, *C. albicans* produced the most abundant and complex biofilms, composed of yeasts and filaments embedded in large amounts of extracellular matrix, and *C. auris* strains produced the least abundant biofilms, composed mainly of densely packed yeasts.

Results of the *Galleria mellonella in vivo* model showed that *C. albicans* was more pathogenic than *C. auris*, and the phenotype of *C. auris* strains induced different outcomes in the model.

Susceptibility studies revealed that *C. auris* strains displayed greater tolerance to antifungals in comparison to *C. albicans* and *C. parapsilosis* strains. In addition, biofilms produced by all strains were much more resistant than planktonic yeasts, and biofilms produced by *C. auris* clinical isolates were resistant to all tested antifungals.

Finally, antifungal treatment of *C. auris* biofilms significantly reduced its viability and covered surface, being anidulafungin the most effective drug.

Characterization of sol-gel coatings revealed that the presence of the coating without antifungal load decreased the adherence of *C. albicans*, but increased up to 65 times the adherence of *C. parapsilosis*. Anidulafungin-loaded coatings were more effective in preventing biofilm formation by *C. albicans*, while fluconazole-loaded coatings prevented more effectively biofilm formation by *C. parapsilosis*. Treatment with antifungal-loaded coatings showed that the presence of the coating without antifungals was sufficient to reduce biofilms produced by *C. albicans*, and the load with fluconazole or anidulafungin slightly enhanced this effect. In *C. parapsilosis*, presence of the coating stimulated biofilm formation, and the load with fluconazole drastically reduced them by up to 99%. Finally, no cytotoxicity events were observed due to the presence of antifungal-loaded coatings.

A successful biomaterial with real applications in medicine would address these characteristics: being non-cytotoxic and minimally invasive, promoting osseointegration and effectively prevent and/or combat microbial infections. In this work a novel antifungal-loaded hybrid organo-inorganic sol-gel coating has been

characterized. It can be easily manufactured and directly applied to the implant surface. The sol-gel is biodegraded within the first 24-48 hours post-intervention, the critical period for the development of an infection. In addition, biodegradation allows the release of phosphorous compounds and antifungal drugs to the surrounding environment, promoting osseointegration and preventing fungal biofilm formation, presenting this coating as a promising tool for reducing fungal PJI incidence.

1. Introducción

1.1. El género *Candida*

El género *Cándida* designa a un grupo muy heterogéneo de especies de hongos clasificadas dentro del Filo de los Ascomicetos. Son hongos levaduriformes, con un ciclo reproductivo principalmente asexual mediante gemación (Tibayrenc 1997). Ciertas especies como *Candida albicans* o *Candida dubliniensis* son pleomorfas, cuentan con la capacidad de crecer como levaduras/blastoconidias/blastosporas o formando un pseudomicelio compuesto por elementos filamentosos, principalmente hifas o pseudohifas, en función de las condiciones del medio (Sudbery 2011). Otras especies como *Candida glabrata* solo existen en forma de blastoconidias (Silva *et al.* 2012).

De las aproximadamente 200 especies conocidas solo unas dos decenas tienen importancia clínica debido a que se comportan como patógenos oportunistas (Vazquez-Gonzalez *et al.* 2013, Kullberg and Arendrup 2015), siendo los agentes etiológicos más frecuentes de infecciones nosocomiales por hongos en todo el mundo (Chakrabarti 2005, Ameen 2010). Entre las más importantes destacan *Candida albicans*, el complejo *Candida parapsilosis* (que incluye a *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*), *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae* (Pfaller and Diekema 2007) y la recientemente descubierta *Candida auris* (Satoh *et al.* 2009). Además, estas especies cuentan con la capacidad de formar una biopelícula o *biofilm*, con importantes implicaciones en la patogenicidad y la adquisición de resistencia a agentes antimicrobianos y desinfectantes (Cavalheiro and Teixeira 2018).

1.2. Pared celular en *Candida*

El organismo modelo en el estudio de las paredes celulares en el género *Candida* es *C. albicans*, debido a su importancia clínica y epidemiológica.

1. Introducción

La pared celular en el género *Candida* está estructurada en diferentes capas (Gow *et al.* 2011), (**Figura 1.1**), y está compuesta en un 50-60% por polímeros complejos de glucosa (β -1,3- y β -1,6-glucano), en un 1-3% por quitina (formada por cadenas de β -1,4-N-acetilglucosamina) y en un 30-40% por glucoproteínas de manosa (Shepherd 1987). Los complejos de glucanos y quitina son los responsables de dar forma y resistencia a la pared al formar un entramado rígido que sirve de anclaje para otras proteínas, mientras que las manoproteínas aportan propiedades superficiales a la pared al intervenir en la adherencia a sustratos o la interacción con células del sistema inmune (Chaffin *et al.* 1998).

Específicamente, la presencia residuos de polisacáridos presentes en la zona exterior de la pared, como los β -1,2-mananos, son responsables de la hidrofobicidad de la misma, esencial en los procesos adherencia a superficies y la posterior formación de biopelículas (Jigami and Odani 1999).

Otros elementos secundarios de la pared celular incluyen lípidos como el fosfolipomanano, con propiedades inmunomoduladoras (Mille *et al.* 2004).

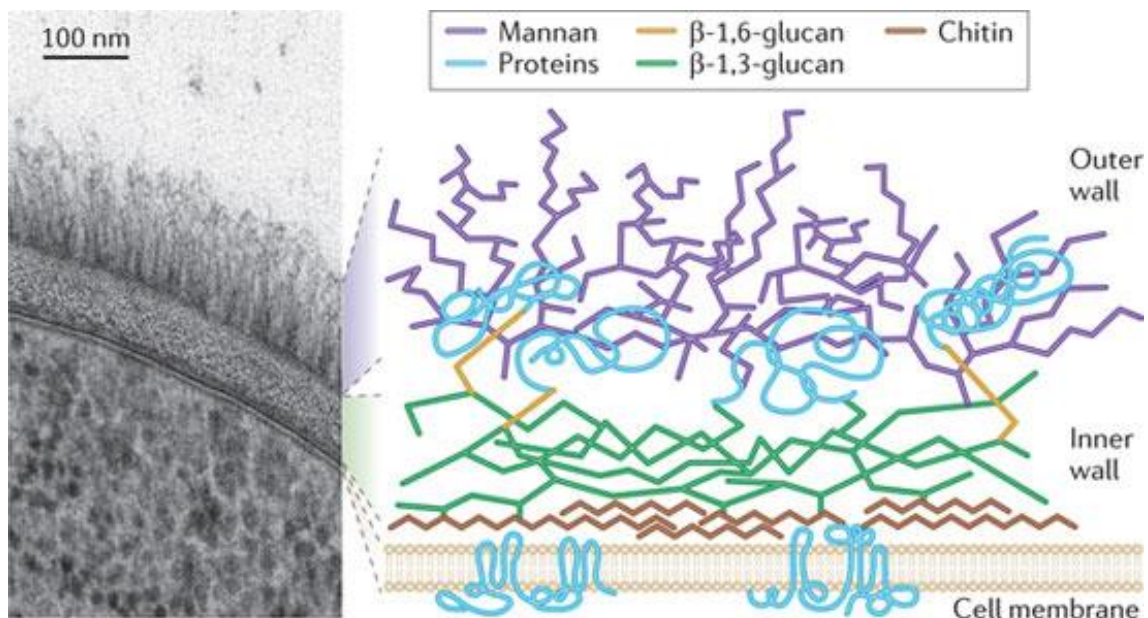


Figura 1.1. Ultraestructura de la pared celular de los hongos levaduriformes y su representación esquemática. Figura tomada de Neil A.R. Gow *et al.* *Candida albicans* morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. 2011. Nature Reviews Microbiology 10(2):112-22.

Por debajo de la pared celular se encuentra la membrana plasmática del hongo. Ésta está constituida de forma similar a las de las células animales, es una bicapa lipídica compuesta por fosfolípidos y estabilizada por esteroides en la que se anclan proteínas a través de diferentes interacciones. La principal diferencia reside en que el esteroide encargado de aportar fluidez y estabilidad a la membrana es el ergosterol. (Weete *et al.* 2010).

1.2.1. Implicaciones en la resistencia a agentes antimicrobianos

Las implicaciones de la estructuración de la membrana y la pared celular en la aparición de resistencias a agentes antimicrobianos son notables, y de hecho sus componentes y las vías de síntesis de éstos son la diana de acción de los fármacos existentes (Odds *et al.* 2003) y el punto de partida en el diseño de nuevos compuestos antifúngicos (Sangamwar *et al.* 2008).

Los antifúngicos más comúnmente usados son los azoles, las equinocandinas y los polienos.

Entre los principales mecanismos de adquisición de resistencia a azoles se encuentran 1: la sobreexpresión de bombas de expulsión en la membrana, lo que reduce la concentración del antifúngico, 2: la sobreexpresión o alteración de la diana de acción del fármaco, en este caso la lanosterol-14- α -esteroide desmetilasa (también conocida como citocromo P450), lo que dificulta la acción del fármaco; y 3: el bypass de la ruta metabólica que inhibe el antifúngico (Sanguinetti *et al.* 2015). Los azoles bloquean la transformación del lanosterol en ergosterol, llevando a la acumulación de 14- α -metil-3,6-diol, tóxico para el hongo, sin embargo, mutaciones en el gen ERG3 permiten al citocromo P450 convertir este compuesto en 14- α -metilfecosterol, que reemplaza la función del ergosterol (Kelly *et al.* 1997).

Por otra parte, la presencia de grandes cantidades de β -1,3-glucano en la matriz extracelular produce la unión y el secuestro de los azoles (Mukherjee *et al.* 2003), y participan en la resistencia a polienos y equinocandinas (Nett *et al.* 2010).

1. Introducción

Los mecanismos de resistencia a equinocandinas se basan en 1: la aparición de mutaciones puntuales en los genes de las subunidades de la β -1,3-D-glucano sintasa, disminuyendo su afinidad por el fármaco (Beyda *et al.* 2012). Este mecanismo parece estar más conservado en *C. parapsilosis*, que muestra de forma consistente altas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para las equinocandinas (Pfaller *et al.* 2011). 2: La activación de la respuesta adaptativa a estrés, que incrementa la concentración de quitina en la pared celular en respuesta a la disminución de la concentración del β -1,3-glucano (Munro *et al.* 2007).

Por último, la adquisición de resistencia a polienos es muy poco frecuente y los mecanismos por lo general están poco caracterizados. Por ejemplo, en *C. tropicalis* se ha identificado un aumento significativo de la concentración de β -1,3--glucano en la pared celular tras su exposición a anfotericina B, lo que aumenta su grosor e impide que el fármaco interaccione con el esterol de la membrana (Mesa-Arango *et al.* 2014). Otros autores han demostrado que variaciones en los niveles de ergosterol y fosfolípidos afectan a la fluidez de la membrana y modulan la resistencia a azoles y polienos en *C. albicans* (Kohli *et al.* 2002) y que defectos en la síntesis de la membrana o mutaciones en los enzimas responsables provocan la aparición de cepas resistentes (Hitchcock *et al.* 1987, Yamaguchi 1999). Un tercer grupo de autores proponen que un buen número de resistencias a anfotericina B puede deberse a una mala penetración del compuesto en el tejido afectado (Patterson 2003).

1.3. Epidemiología y patogenicidad

Especies como *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* son consideradas patobiontes (Sam *et al.* 2017), en condiciones normales forman parte del micobioma (fracción de hongos que se integran en la microbiota) en aproximadamente el 40% de las personas adultas sanas y conviven como comensales en las mucosas y tracto gastrointestinal tras colonizarlo en las primeras semanas de vida del individuo (Odds 1984). Desde la colonización, el hongo vive en equilibrio con otras especies bacterianas y con el sistema inmune (Erwig and Gow 2016), sin embargo, cuando estos elementos se ven alterados se desencadena la infección oportunista (Eggimann *et al.* 2003). Otras

especies como *C. parapsilosis* o *C. auris* cuentan con una gran capacidad de supervivencia en el medio ambiente mediante la formación de biopelículas y se encuentran asociadas a ambientes antrópicos, provocando infecciones de origen exógeno o nosocomial (Merseguel *et al.* 2015). De hecho, se han reportado casos de supervivencia de células de *C. auris* de hasta 14 días en superficies deshidratados (Welsh *et al.* 2017). Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos de colonización de estas especies es limitado y se atribuye a las altas capacidades de adherencia y proliferación que exhiben las levaduras hijas dispersadas desde las biopelículas (Uppuluri *et al.* 2010).

Durante la infección, el hongo despliega un arsenal de factores de virulencia entre los que se encuentran elementos de reconocimiento de tejidos específicos del hospedador (adhesinas), secreción de proteinasas y fosfolipasas, variación de la capacidad antigénica, modulación de la capacidad invasiva mediante morfogénesis (cambios entre formas unicelulares y filamentosas) y la capacidad de formar biopelículas, esencial en la evasión del sistema inmune, la resistencia a tratamientos antimicrobianos y la colonización de dispositivos médicos (Calderone and Fonzi 2001).

Existe una amplia variedad de síndromes clínicos causados por estos patógenos, que van desde micosis superficiales leves a infecciones del tracto urinario o digestivo e infecciones sistémicas graves, como la candidemia o la candidiasis invasiva (Cornely *et al.* 2012), con un rango de mortalidad asociada de en torno al 40% en las causadas por *C. albicans*. De hecho, actualmente se estiman unos cien millones de casos de vaginitis recurrente y cerca de 50.000 muertes al año por infecciones sistémicas en todo el mundo (Brown *et al.* 2012, Kullberg and Arendrup 2015).

En los últimos veinte años, la incidencia y prevalencia de estas infecciones ha experimentado un elevado crecimiento, especialmente en pacientes inmunocomprometidos y aquellos hospitalizados en unidades de cuidados intensivos (UCIs) con enfermedades subyacentes graves (Espinell-Ingroff 2009). Los factores de riesgo asociados al desarrollo de una infección sistémica por hongos se pueden dividir en específicos del paciente y específicos de la hospitalización y el tratamiento. Los

1. Introducción

específicos del paciente de mayor importancia incluyen la presencia de enfermedades inmunosupresoras, neutropenia, edad, presencia de comorbilidades, cirugías previas y la previa exposición a antimicrobianos de amplio espectro (Bouza and Munoz 2008, Playford *et al.* 2008). Los factores de riesgo más importantes asociados a la hospitalización y el tratamiento son las estancias de larga duración en UCIs, que incluyen la utilización de dispositivos médicos implantables (catéteres, tubos de nutrición parenteral, prótesis osteoarticulares); el uso de procedimientos quirúrgicos invasivos, terapias inmunosupresoras y la colonización por el patógeno durante la estancia (Almirante *et al.* 2006, Eggimann and Pittet 2014). De hecho, se estima que el 80% de estos pacientes es colonizado por especies de *Candida* tras la primera semana de estancia en la UCI, y de los cuales entre el 5% y el 10% desarrolla una candidiasis invasiva, cuyo diagnóstico temprano continúa siendo problemático a pesar del avance de las técnicas de identificación (Guery *et al.* 2009), lo que explica la alta mortalidad registrada.

Numerosos estudios han discutido sobre las causas de este aumento de la incidencia, y actualmente existe un consenso en torno al uso extensivo de terapias inmunosupresoras, antimicrobianos de amplio espectro y procedimientos quirúrgicos invasivos (Hagerty *et al.* 2003, Kojic and Darouiche 2004, Bongomin *et al.* 2017), lo que también acarrea elevados costes a los servicios sanitarios.

Históricamente, la especie más frecuente aislada en infecciones sistémicas causadas por hongos ha sido *C. albicans*, sin embargo, debido principalmente a la mejora en las técnicas de diagnóstico y a los motivos expuestos anteriormente las especies no-*albicans* están aumentando su prevalencia (Basseti *et al.* 2006). Por ejemplo, en infecciones invasivas, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* representan el 95% de los aislados actualmente (Pfaller and Diekema 2007). Teniendo en cuenta las especies no-*albicans*, *C. glabrata* es aislada con mayor frecuencia en adultos (Krcmery and Barnes 2002), *C. parapsilosis* se aísla más frecuentemente en infecciones en neonatos (especialmente los de bajo peso) y pacientes recibiendo nutrición parenteral (Trofa *et al.* 2008); y *C. tropicalis* suele ser la tercera especie más aislada y está

asociada a pacientes neutropénicos o con presencia de enfermedades malignas (Nucci and Colombo 2007).

De entre estas especies, *C. parapsilosis* es la que ha experimentado un mayor aumento en su incidencia, y es normalmente la segunda especie más aislada por detrás de *C. albicans* en fungemias asociadas al uso de dispositivos médicos implantables, aunque la mortalidad asociada es menor (Canton *et al.* 2011). Cabe destacar que la incidencia de *C. parapsilosis* en infecciones protésicas y sistémicas supera a la de *C. albicans* en Asia y Sudamérica (Falagas *et al.* 2010).

Por otra parte, cada vez es más frecuente la aparición de aislados e incluso especies que presentan resistencia a alguno o a varios antifúngicos empleados en los tratamientos, especialmente a los azoles, y varios estudios han descrito que el uso de fluconazol en profilaxis y como agente terapéutico ha influido positivamente en esta selección, provocando cambios en la epidemiología de estas infecciones (Lortholary *et al.* 2011). Por ejemplo, *C. krusei* y *C. auris* presentan una alta resistencia a estos compuestos de forma intrínseca, con ratios que llegan hasta el 80% de los aislados clínicos (Pfaller *et al.* 2011, Chowdhary *et al.* 2018).

Debido a esto, actualmente la Sociedad Europea de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (ESCMID) recomienda el uso de equinocandinas como primera línea de tratamiento en pacientes con infecciones sistémicas graves y aquellos con exposición previa a los azoles, reservando éstos para infecciones menos severas (Cornely *et al.* 2012). Sin embargo, la aparición de algunas cepas y especies resistentes a estos compuestos (como *C. guilliermondii*) se ha indicado en varios estudios y se espera que esta tendencia continúe (Chen *et al.* 2009).

1.3.1. Una nueva especie de *Candida no-albicans*: *Candida auris*

Descubierta en 2009 en Japón (**Satoh *et al.* 2009**), esta especie se ha extendido por todo el mundo causando candidiasis invasivas y fungemias de origen nosocomial en pacientes inmunodeprimidos ingresados en UCIs, con tasas de mortalidad de hasta el 72% (Calvo *et al.* 2016, Lockhart *et al.* 2017, Ruiz Gaitan *et al.* 2017). Entre las

1. Introducción

características de este patógeno destacan la resistencia a antifúngicos, especialmente fluconazol y en menor medida los polienos, con algunas cepas exhibiendo tolerancia a las equinocandinas (Chowdhary *et al.* 2018, Dudiuk *et al.* 2019); así como la capacidad de producción de factores de virulencia a niveles similares a los de *C. albicans* tales como fosfolipasas, proteinasas y formación de biopelículas (Larkin *et al.* 2017). Además, se ha demostrado la transmisión inter e intrahospitalaria y ambiental de este patógeno, llegando a sobrevivir en ambientes deshidratados y tolerar algunos agentes desinfectantes (Cadnum *et al.* 2017, Piedrahita *et al.* 2017). A esto se suma a una alta tasa de colonización de superficies bióticas y abióticas, habiéndose recuperado aislados de las manos de personal sanitario y zonas en contacto con los pacientes (McCarthy 2016); y una alta persistencia incluso en pacientes recibiendo tratamiento antifúngico (Schelenz *et al.* 2016).

Las primeras investigaciones pusieron de manifiesto que la detección temprana del patógeno y el inicio del tratamiento antifúngico correcto se correlacionaba con una menor mortalidad en los pacientes (Todd 2017). Sin embargo, en muchos laboratorios de países en vías de desarrollo, donde más casos se registran, como India, no cuentan con los recursos y sistemas necesarios para su identificación rápida y correcta (MALDI-TOF y PCR principalmente) (Kordalewska and Perlin 2019). Actualmente se trabaja en la elaboración de medios de identificación precisos y asequibles teniendo en cuenta las características que se van descubriendo del patógeno, como la capacidad de crecer a 42°C o la incapacidad de formar tubos germinativos o pseudohifas o de crecer en medios que contengan N-acetilglucosamina o cicloheximida (0.1-0.01%) (Mahmoudi *et al.* 2019).

Entre las hipótesis que se manejan sobre su aparición, se ha propuesto el aumento de temperatura de los bosques templados como factor determinante, lo que habría permitido al patógeno proliferar y transmitirse entre algunas especies de aves, que eventualmente acabaría con la transmisión a los humanos (Casadevall *et al.* 2019).

Nuevas investigaciones han indicado que este patógeno está distribuido en cuatro clados geográficos: surasiático, surafricano, sudamericano y asiático oriental (Lockhart *et al.* 2017). Filogenéticamente hablando, la especie pertenece al clado de *C.*

haemulonii y también está estrechamente relacionada con *C. lusitaniae* y *C. guillermoidii*, con las que comparte la identidad del 80% de su genoma (Chatterjee *et al.* 2015). Estas especies presentan una alta resistencia a los azoles y los polienos, lo que explicaría las resistencias observadas en *C. auris* (Cendejas-Bueno *et al.* 2012, Lepak *et al.* 2017). Por otra parte, se han descubierto expansiones en un alto número de genes ortólogos a *C. albicans* que intervienen en la resistencia a antimicrobianos, entre ellos genes que codifican transportadores ABC, sideróforos y lipasas (Munoz *et al.* 2018).

Actualmente no hay unas guías de referencia de desinfección, control y tratamiento específicas para *C. auris*, y tampoco existen puntos de corte de concentraciones mínimas inhibitorias, por lo que su elaboración es considerada una prioridad debido a la capacidad de este patógeno de producir nuevos brotes. Por otra parte, recientemente se han descubierto dos antifúngicos prometedores con alta efectividad en *C. auris*: SCY-078, de Scynexis pharmaceuticals (Larkin *et al.* 2017) y VT-1598 de Viamet pharmaceuticals (Wiederhold *et al.* 2019).

1.4. Formación de biopelículas en dispositivos médicos

Una biopelícula o *biofilm* se define como una comunidad compleja de microorganismos embebidos en una matriz de material extracelular sintetizada por la propia comunidad, adherida a una superficie biótica o abiótica (Costerton 1995). En la actualidad se estima que prácticamente la totalidad de los microorganismos existentes tienen la capacidad de crecer formando una biopelícula, siendo esta la forma más común en la que se encuentran en la naturaleza (Costerton 2004). Estas comunidades pueden originarse de forma monoclonal a partir de un solo individuo, aunque por lo general son mixtas, formadas por diferentes especies de microorganismos que comparten un nicho ecológico común (Davey and O'Toole G 2000). Esta forma de vida representa una ventaja adaptativa y es un ejemplo de comportamiento colectivo e interdependiente dentro de la comunidad, que coopera para sobrevivir y adaptarse a las condiciones cambiantes del medio (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

1. Introducción

En los últimos años, las biopelículas han ganado importancia al tener un papel crítico en el desarrollo de infecciones asociadas a biomateriales en el ámbito clínico debido al creciente uso de éstos (Rochford *et al.* 2012). De hecho, se estima que la mitad de las infecciones nosocomiales están asociadas a su uso y que las biopelículas son responsables de más de dos millones de infecciones al año (Chu 2018). Estas infecciones son difíciles de detectar y tratar debido a las propias características de las biopelículas. Por una parte, en una infección *in vivo* la biopelícula no se comporta de la misma forma que en los modelos *in vitro*: no es una gran estructura tridimensional cohesionada, sino que se conforma por pequeñas colonias dispersas en la superficie del biomaterial y además puede estar compuesta por distintos componentes debido a la interacción con las moléculas del hospedador (Bjarnsholt *et al.* 2013). Por otra parte, durante la maduración de la biopelícula se sintetiza la matriz extracelular, que ofrece protección frente al sistema inmune y resistencia a los antimicrobianos, y se producen los factores de virulencia, que producen daños en el tejido del paciente (Monroe 2007). Debido a estas características, los tratamientos no suelen responder adecuadamente, lo que puede desembocar en el desarrollo de infecciones sistémicas y/o un mal funcionamiento del dispositivo. Todo esto genera una alta morbilidad y/o elevados costes a los sistemas nacionales de salud (Schierholz and Beuth 2001).

En este contexto, el género *Candida* representa la primera causa de infección por hongos asociada a biomateriales de uso clínico (Kojic and Darouiche 2004). Concretamente, es responsable del 65-90% de las infecciones de prótesis dentales (Gendreau and Loewy 2011, Talpaert *et al.* 2015), el 8-16% de las infecciones asociadas a catéter venoso central o urinario (Ramage *et al.* 2006) y el 1-2% de las infecciones protésicas, siendo *C. albicans* la especie más común seguida por *C. parapsilosis* (Benito *et al.* 2019). La mortalidad debida al desarrollo de una candidemia asociada a la infección de un dispositivo médico se estima en un 45% (Playford *et al.* 2008).

1.4.1. Mecanismos de formación de biopelículas sobre biomateriales

El proceso de formación de biopelículas sobre biomateriales se puede dividir en cinco fases: 1. Formación de la capa de condicionamiento 2. adherencia inicial reversible del

patógeno al sustrato, 3. proliferación y adherencia irreversible, 4. maduración y 5. dispersión (Donlan 2001) (**Figura 1.2B**).

La capa de condicionamiento se forma debido a la presencia de un cuerpo extraño en el organismo en los primeros minutos tras su implantación (Anderson *et al.* 1990). La composición de esta capa depende del tipo de biomaterial y el sitio de inserción del mismo, pero en líneas generales está compuesta por albúmina, fibrinógeno, fibronectina, gamma-globulina y proteínas del complemento (principalmente C3 y C5) (Anderson *et al.* 2008). Esta capa modifica las propiedades superficiales del material como la carga, tensión superficial o hidrofobicidad; “marca” el elemento al sistema inmune y lo prepara para ser colonizado por las células del organismo como monocitos, leucocitos y plaquetas, que provocarán, tras una inflamación inicial, el recubrimiento de la superficie por una cápsula fibrosa, que reduce la interacción directa con el biomaterial y minimiza el riesgo de infección (Jaffer *et al.* 2015, Arciola *et al.* 2018).

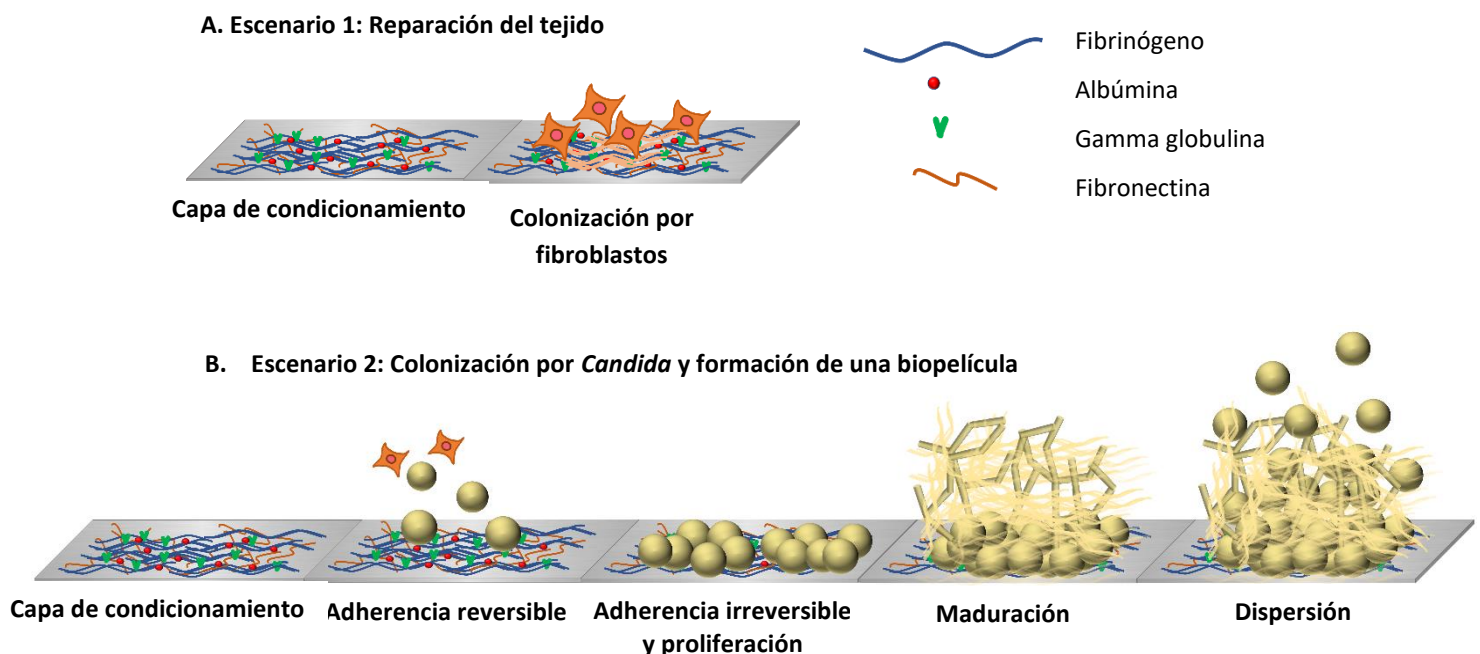


Figura 1.2. Escenarios posibles tras la implantación. **A.** Reparación del tejido y formación de una cápsula fibrosa que aísla el biomaterial. **B.** Si se produce la colonización del biomaterial por levaduras se inicia la formación de una biopelícula, que culmina con la dispersión de levaduras hijas y la expansión de la infección.

1. Introducción

Una vez formada la capa de condicionamiento, ésta representa un sustrato ideal para la adherencia de células del tejido local, sin embargo, en presencia de microorganismos se establece la llamada “carrera por la superficie” (Gristina 1987), en la que microorganismos y células compiten por la colonización del biomaterial. Si ganan las células el material se integrará en el tejido (**Figura 1.2A**), pero si ganan los microorganismos comenzará la formación de una biopelícula, que debido a la alta tasa de duplicación del microorganismo suele darse antes que la formación del tejido (Zhao *et al.* 2014) (**Figura 1.2B**). La patogénesis de estas infecciones es, por tanto, el resultado de la interacción entre el microorganismo, el biomaterial y el hospedador.

Al igual que en bacterias, la formación de biopelículas por *Candida* es un proceso complejo regulado por múltiples factores (Araujo *et al.* 2017). En el primer contacto que se establece con el biomaterial las levaduras se comportan como partículas coloidales que se depositan sobre su superficie, y se establece una primera fase de adherencia reversible través de fuerzas no específicas como fuerzas electrostáticas y de Van der Waals (He *et al.* 2006).

Tras la adherencia reversible, en las especies de *Candida* la adherencia irreversible se da mediante interacciones hidrófobas debido a las propiedades de la pared celular (Minagi *et al.* 1985). Además, en la membrana plasmática se expresan proteínas como EAP1 (*enhanced adherence to polystyrene*) (Li and Palecek 2008), ALS1 y ALS5 (*agglutinin-like sequence*), que contribuyen a este efecto y se unen a proteínas de la capa de condicionamiento como fibronectina y fibrinógeno (Henriques *et al.* 2006). En esta etapa se producen las primeras poblaciones de células *persisters*, variantes fenotípicas con un metabolismo muy reducido que son capaces de resistir la acción de los antimicrobianos, y son la base de la reaparición de las infecciones tras el tratamiento (LaFleur *et al.* 2006).

Una vez establecida la adhesión irreversible comienza la etapa de maduración, caracterizada por la síntesis de material extracelular, proliferación y filamentación (Ramage *et al.* 2006), en definitiva, se da inicio a la formación de una biopelícula. Durante la maduración también se expresan numerosos factores de virulencia, tales como proteinasas, enzimas hidrolíticas, fosfolipasas y lipasas, que contribuyen a la

infección (Wachtler *et al.* 2012). En *Candida*, la filamentación es el proceso por el cual las levaduras comienzan a formar estructuras cilíndricas y alargadas conocidas como hifas o pseudohifas (**Figura 1.3**). Se ha demostrado que la filamentación es esencial para la adquisición de nutrientes en medios pobres y la invasión de tejidos durante una infección (Moyes *et al.* 2015), ya que además dificulta la fagocitosis por parte de macrófagos en comparación con el estado de levadura (Uwamahoro *et al.* 2014).

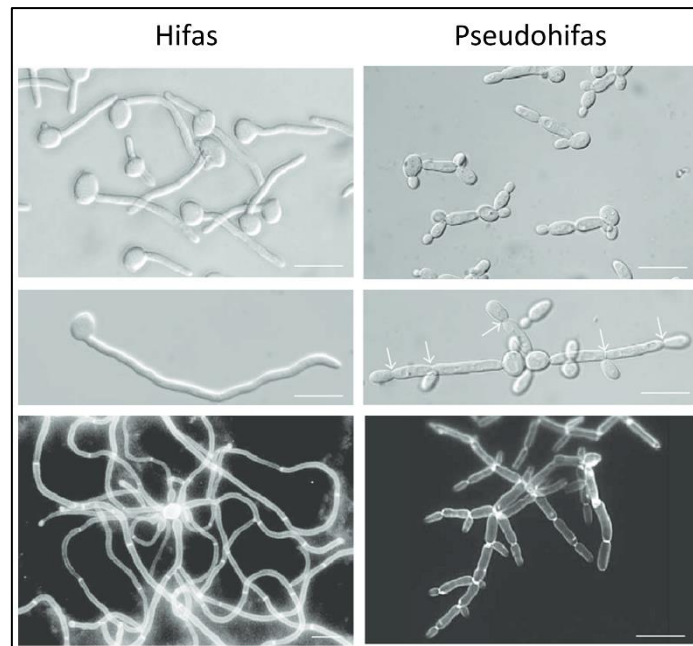


Figura 1.3. Morfología de hifas y pseudohifas. La principal diferencia entre estas estructuras es el proceso de formación. Una hifa se forma a partir de una sola levadura que comienza a expandirse formando un tubo germinativo el cual se alarga en su extremo apical y comienza a formar la estructura tubular. A la vez que la célula inicial se expande, se divide por gemación y las células hijas se separan de la madre mediante la formación de septos formados por pared celular. En cambio, una pseudohifa se inicia mediante la gemación de la célula madre, pero las células hijas no se separan mediante septos y permanecen unidas, compartiendo una pared celular común que presenta constricciones en la misma posición en la que estarían los septos. Imagen tomada de M. Anaul Kabir *et al.* *Candida albicans*: A model organism for studying fungal pathogens. 2015. ISRN Microbiology.

En este punto muchas de las proteínas que intervienen en la adherencia también intervienen en la formación de hifas en *C. albicans* y *C. tropicalis*. EAP1 y otras como ALS3, HWP1, HWP2 y RBT1 contribuyen al proceso (Ene and Bennett 2009), y una vez que las hifas se han formado, HWP1 y ALS3 median la agregación entre células y contribuyen a establecer una unión más robusta con el sustrato (Nobile *et al.* 2006).

1. Introducción

Conjuntamente con la filamentación se da la síntesis de la matriz extracelular, que fortalece la estructura de la biopelícula y actúa como una barrera física que protege de los ataques del sistema inmune y los antimicrobianos (Xie *et al.* 2012). Esta matriz está compuesta por carbohidratos (41%, que incluye β -1,3-glucano mayoritariamente y otros glucanos como β -1,6-glucano, proteínas (5%), hexozaminas (Al-Fattani and Douglas 2006), fósforo, ácido urónico y ADN extracelular, el cual aporta estabilidad y contribuye a la adquisición de resistencias (Martins *et al.* 2010).

La composición final de una biopelícula madura varía dependiendo de la especie. Así, las formadas por *C. albicans* y *C. tropicalis* son más complejas, con abundante matriz extracelular, levaduras y elementos filamentosos (hifas y pseudohifas) (Finkel and Mitchell 2011), mientras que las formadas por *C. parapsilosis* tienen poca matriz extracelular y solo forman pseudohifas (Lattif *et al.* 2010), y otras especies como *C. glabrata* o *C. auris* no forman estas estructuras y la biopelícula se compone de gran cantidad de levaduras densamente agregadas y mínimas cantidades de matriz extracelular (Silva *et al.* 2012, Borman *et al.* 2017) (**Figura 1.4**).

Tras la maduración, la limitación de los nutrientes y la estabilización del crecimiento llevan por un lado a la sobreexpresión de genes que intervienen en la adquisición de resistencias (biosíntesis de ergosterol, facilitadores mayores, quitinasas, bombas de expulsión (White *et al.* 1998) y por otro lado a la etapa de dispersión, caracterizada por la liberación de levaduras desde las capas más externas de la biopelícula. Estas células presentan altas capacidades de adherencia, colonización, filamentación y patogenicidad, y son las responsables de diseminar la infección a otros tejidos durante una infección (Uppuluri *et al.* 2010).

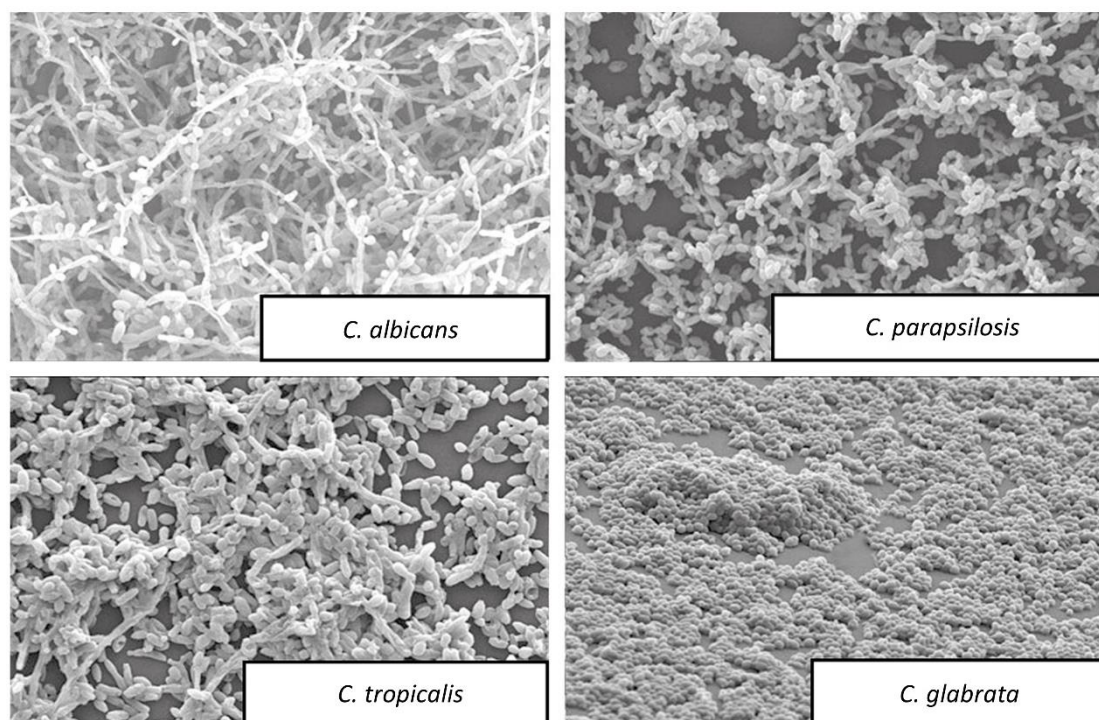


Figura 1.4. Morfología de biopelículas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*. Imagen tomada de Araujo, D *et al.* Portrait of Candida Species Biofilm Regulatory Network Genes. 2017. Trends in Microbiology, January 2017, Vol. 25, No. 1.

1.4.2. Regulación de la formación de biopelículas

Al igual que sucede en bacterias, en *Candida* la maduración de biopelículas está regulada por el sistema *quorum sensing*. Hasta la fecha se han descubierto dos sistemas principales compuestos por EE-Farnesol (Hornby *et al.* 2001) y tirosol (Chen *et al.* 2004), que se liberan dentro de la estructura de la biopelícula. Alem *et al.* demostraron que, en las primeras etapas de formación de la biopelícula, el tirosol estimula la adhesión inicial y la filamentación (Alem *et al.* 2006), mientras que el farnesol tiene el efecto opuesto y está involucrado en la producción de factores de virulencia y la dispersión (Ramage *et al.* 2002). La transducción de señales es compleja y se está investigando actualmente, pero se sabe que culmina en la expresión de factores bien conocidos desde hace tiempo. El más importante de ellos es BCR1 (*biofilm cell wall regulator*) (Ding and Butler 2007). Esta proteína es esencial y controla la expresión de numerosas proteínas involucradas en la adherencia inicial a sustratos por parte de levaduras y elementos filamentosos (Srikantha *et al.* 2013). Otros factores

1. Introducción

que regulan la adherencia son MKC1 y ACE2, que intervienen en la filamentación o ZAP1, un regulador de la adquisición de Zinc (Finkel and Mitchell 2011). Finalmente, las moléculas del quorum sensing también son moduladoras del sistema inmune. Por ejemplo, el farnesol es un potente estimulador de la quimiotaxis de macrófagos, por lo que la regulación de su secreción durante las primeras etapas de la infección podría ayudar a eludir al sistema inmune (Hargarten *et al.* 2015).

1.5. Infección de prótesis por *Candida*

La infección de prótesis, aunque infrecuente, es uno de los motivos principales para la realización de una artroplastia de revisión y una de las mayores complicaciones subsiguientes a una artroplastia. Estas infecciones son una condición devastadora que debilita al paciente, cursando con dolor subagudo o crónico, inflamación de la articulación, destrucción del tejido periprotésico y muerte en algunos casos de infección sistémica grave (Tande and Patel 2014). Por otra parte, el tratamiento de estas infecciones es complejo, lo que aumenta el gasto ocasionado a los sistemas de salud (Kurtz *et al.* 2012). Entre los agentes etiológicos más comunes destacan los estafilococos, mientras que la infección por hongos tiene una incidencia del 1-2% y en torno al 80% está causada por especies del género *Candida*, con *C. albicans* y *C. parapsilosis* como especies más frecuentes (Benito *et al.* 2019). La patogenia de las infecciones incluye el desarrollo de una biopelícula sobre la superficie de la prótesis que a menudo afecta también al tejido circundante. Debido a su baja frecuencia y a los desafíos que presentan este tipo de infecciones a nivel tanto de diagnóstico como de tratamiento, el número de estudios es muy bajo y hay una gran variabilidad en los métodos utilizados y los resultados obtenidos por cada grupo. En consecuencia, actualmente no existen protocolos claramente establecidos para el diagnóstico, tratamiento y manejo de los pacientes (Nace *et al.* 2019).

Diagnóstico. Es uno de los principales desafíos de este tipo de infecciones. En primer lugar, los pacientes que las sufren tienen características clínicas distintas a aquellos que sufren infecciones de prótesis por bacterias, y suelen tener asociado algún tipo de factor de riesgo, tales como inmunosupresión causada por enfermedades, infecciones

subyacentes o tratamientos (antineoplásicos, corticosteroides), haber hecho uso inapropiado de antimicrobianos o haber tenido implantado un catéter (venoso, urinario o de alimentación parenteral), lo que aumenta el riesgo de fallo terapéutico y del desarrollo de una recidiva (Azzam *et al.* 2009). Por ejemplo, en el estudio de Azzam *et al.* se detectó que el 87% de estos pacientes presentaba enfermedad cardíaca, uso crónico de esteroides y enfermedades renales o hepáticas, y en otro estudio realizado por Schoof *et al.* se indicó que el 66% de los pacientes padecía artritis reumatoide, diabetes mellitus o habían sufrido anteriormente infección de prótesis por bacterias (Schoof *et al.* 2015). Además, la hospitalización prolongada y el sometimiento a múltiples cirugías de revisión también aumentó el riesgo de sufrir estas infecciones.

La inmunosupresión se considera el mayor factor de riesgo debido a que los elementos de la inmunidad innata son los primeros en interaccionar con el hongo y son esenciales en la diferenciación de linfocitos T en Th1 y Th2 (linfocitos T helper), que se cree que son la principal línea de defensa antifúngica (Garcia-Vidal *et al.* 2013).

La presentación de estas infecciones es muy variable, y debido a que el hongo crece despacio y evadiendo el sistema inmune las infecciones tienden a ser crónicas o tardías. Además, los pacientes suelen presentar síntomas no específicos como dolor crónico sin la presencia de eritema, hinchazón, efusión o fiebre (Jakobs *et al.* 2015). Además, la alta variabilidad en los test empleados para detectar infecciones protésicas, normalmente estandarizados para infecciones por bacterias, contribuye a dificultar y retrasar el diagnóstico. Por ejemplo, entre el 23% y el 50% de los pacientes presenta valores normales en las medidas de proteína C reactiva y la tasa de sedimentación eritrocítica (Jakobs *et al.* 2015, Schoof *et al.* 2015). Por otra parte, los análisis del líquido sinovial con elevados linfocitos y alto porcentaje de polimorfonucleares son un buen indicativo de infección crónica, pero no hay evidencias que establezcan unos límites claros para la infección por hongos (Azzam *et al.* 2009). En cuanto a la identificación por cultivo, en torno a la mitad suelen presentar cultivos negativos debido a la dificultad de aislar el patógeno (Yoon *et al.* 2017), aunque la realización de múltiples tomas de muestras de la prótesis y el cultivo en medios selectivos mejora sustancialmente la sensibilidad (Jakobs *et al.* 2015).

1. Introducción

Entre las técnicas más eficientes en el diagnóstico se encuentran los hemocultivos (Geller *et al.* 2016) y las técnicas de biología molecular como PCR, MALDI-TOF y la secuenciación del 16S RNA (Tarabichi *et al.* 2018). Por último, al igual que en las infecciones protésicas causadas por bacterias, el uso de pruebas de imagen puede asistir al diagnóstico, ayudando a localizar zonas de aflojamiento, reacciones del subperiostio y aparición de tractos en el seno cortical (Schoof *et al.* 2015).

Tratamiento. Actualmente el tratamiento de elección es el recambio en dos tiempos (Kuo *et al.* 2018). Este método comienza con una artroplastia de resección, desbridamiento e irrigación seguido de la implantación de un espaciador compuesto de cemento impregnado en antifúngico. Esta primera etapa es seguida por la administración parenteral de antifúngicos, y finaliza con una reimplantación tras la curación de la infección. El éxito de este tratamiento sin embargo presenta gran variabilidad dependiendo de factores como la duración de la administración parenteral de antifúngico, el intervalo hasta la reimplantación, el periodo libre de antifúngicos previo a la reimplantación o la presencia de organismos resistentes, con tasas de éxito muy variables, que oscilan desde el 49,5% a más del 90% (Anagnostakos *et al.* 2012, Kuiper *et al.* 2013, Ueng *et al.* 2013).

Por otra parte, debido principalmente a que los pacientes son en muchos casos inmunodeprimidos y/o presentan comorbilidades, la artroplastia de reimplantación solo llega a hacerse en un 42% de los casos. En la mayoría de ocasiones no se puede realizar debido a la persistencia de la infección o las propias condiciones clínicas del paciente (Azzam *et al.* 2009).

Para algunos de estos casos se ha indicado la ventaja de realizar una revisión en tiempo único y usar espaciadores articulados de metal o polietileno cementados con altas dosis de antifúngicos, con tasas de éxito de hasta el 83,3% (Siddiqi *et al.* 2018).

1.5.1. Nuevos biomateriales para la prevención y el tratamiento de la infección protésica causada por hongos

Actualmente, el uso de cementos acrílicos impregnados con altas dosis de antifúngicos es una valiosa técnica para el tratamiento local de las infecciones protésicas por hongos (Siddiqi *et al.* 2018). Estos cementos están compuestos en su mayoría por polimetilmetacrilato (PMMA) que debido a sus propiedades termomecánicas similares al hueso permite una transición del estrés mecánico desde el implante al tejido óseo con una distribución de cargas casi fisiológica (Glassman *et al.* 2001). Sin embargo, están lejos de ser un tratamiento óptimo e ideal por varios motivos: 1. El PMMA no promueve la osteointegración; 2. La alta carga de antifúngico puede comprometer la estabilidad mecánica del cemento; 3. Las cantidades de antifúngico no están estandarizadas y existe preocupación ante las posibles interacciones que puedan tener con otros fármacos (Nace *et al.* 2019); 4. La elución de los antifúngicos, especialmente la anfotericina B, no es eficiente (Cunningham *et al.* 2012). Por otra parte, los estudios con cementos impregnados con fluconazol o voriconazol son muy escasos, aunque en principio han dado buenos resultados (Martinez-Moreno *et al.* 2017).

A la hora de diseñar una estrategia en la prevención y/o el tratamiento de infecciones protésicas se han seguido varias aproximaciones. Una de ellas se basa en la modificación de la superficie del material, ya sea el cemento o el implante, de forma que reduzca la colonización por patógenos a la vez que promueva la osteointegración del implante. En este campo se han obtenido resultados prometedores con cementos compuestos por sulfato cálcico (McConoughey *et al.* 2015), recubrimientos compuestos por ácido poliláctico, colágeno o conteniendo moléculas orgánicas como hidroxiapatita (Bolbasov *et al.* 2018, Sharan *et al.* 2018); o modificaciones de la superficie del biomaterial mediante anodizado (Kumeria *et al.* 2015, Perez-Jorge *et al.* 2017).

Otra estrategia se centra en el diseño de sistemas que permitan la liberación local de antimicrobianos para reducir las infecciones en la superficie del implante. Estos sistemas se han basado principalmente en la fabricación de hidrogeles y recubrimientos cargados con diferentes moléculas como antibióticos, péptidos

1. Introducción

antimicrobianos, nanopartículas de óxidos metálicos y polímeros anti adhesivos o con propiedades antimicrobianas como quitosano (Swartjes *et al.* 2015).

En este aspecto los polímeros ofrecen una mayor versatilidad al permitir su síntesis y su modificación de forma precisa, algo necesario para controlar la liberación del antimicrobiano. En este campo, la tecnología sol-gel ofrece ventajas en la fabricación de recubrimientos al ser una metodología barata y rápida (Schaefer *et al.* 1990, Faustini *et al.* 2014).

El objetivo final, por tanto, sería el diseño de un biomaterial biocompatible que combinase estos tres aspectos, reduciendo la colonización de microorganismos, promoviendo la osteointegración y asegurando la liberación del antimicrobiano.

Siguiendo esta aproximación, en los últimos años se han realizado grandes esfuerzos en el diseño de superficies antimicrobianas, sin embargo, la mayoría se han centrado en infecciones bacterianas prestando poca atención a las provocadas por hongos, por lo que la literatura en este último campo es escasa (Coad *et al.* 2014).

En la prevención de infecciones por hongos destaca el diseño de recubrimientos compuestos por polímeros con propiedades antifúngicas como parileno o quitosano (Zhou *et al.* 2010), nanopartículas de óxidos de metal funcionalizadas con antifúngicos (Paulo *et al.* 2010) o hidrogeles con propiedades antifúngicas (Zumbuehl *et al.* 2007). Otras líneas de investigación se centran en la inmovilización o anclaje de compuestos antifúngicos directamente a la superficie del biomaterial, principalmente sales de amonio cuaternario o (Nikawa *et al.* 2005).

2. Hipótesis

1. La formación de biopelículas por parte de las diversas especies de *Candida* tendría diferencias en función de la especie estudiada.
2. Las propiedades diferenciales entre las especies de *Candida* podrían demostrarse también en un modelo experimental *in vivo* sencillo.
3. Las cepas de *C. auris* son más resistentes a los antifúngicos que otras especies tanto en su forma planctónica como sésil.
4. El tratamiento antifúngico de las biopelículas de *Candida* daría lugar a diversas alteraciones ultraestructurales de las mismas.
5. El desarrollo de un recubrimiento sol-gel organo-inorgánico cargado de antifúngicos permitiría prevenir y tratar las infecciones asociadas a biomateriales causadas por *Candida*, actuando sobre la adherencia y sobre la formación de biopelículas.

3. Objetivos

1. Realizar una caracterización de las cepas, evaluando la capacidad de formación de biopelículas y midiendo la evolución de la producción de biomasa viable, espesor, viabilidad y superficie cubierta desde las 24 a las 96 h mediante microscopía confocal y espectroscopía de fluorescencia.
2. Realizar ensayos de patogenicidad en *Galleria mellonella* con las cepas de *C. auris* y *C. albicans* para comparar el grado de patogenicidad entre las distintas especies y cepas.
3. Evaluar mediante ensayos de microdilución la sensibilidad de las cepas de *C. auris* en estado planctónico y sésil y comparar los resultados con los de las cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis*.
4. Evaluar mediante microscopía confocal el efecto del tratamiento con antifúngicos en las biopelículas producidas por *C. auris*.
5. Realizar un estudio celular y microbiológico de la eficacia antiinfecciosa de un recubrimiento sol-gel cargado con antifúngicos mediante:
 - a. Estudio de adherencia de levaduras al sol-gel.
 - b. Estudio de prevención de la formación de biopelículas.
 - c. Estudio del tratamiento de las biopelículas.
 - d. Estudio de citotoxicidad en células de mamífero.

4. Materiales y métodos

4.1. Identificación, selección y mantenimiento de las cepas utilizadas.

Se seleccionaron las cepas *C. albicans* ATCC 10231 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 y tres aislados clínicos de cada una; y la cepa y *C. auris* DSM 21092 y dos aislados clínicos (**Tabla 4.1**). Todas las cepas se mantuvieron congeladas a -20°C en leche desnatada estéril (Oxoid, Reino Unido), y se cultivaron y mantuvieron a 37°C en placas Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (SGC2) (BioMérieux, Francia). Los aislados clínicos de *C. albicans* y *C. parapsilosis* habían sido previamente identificados mediante MALDI-TOF-TOF usando un sistema Vitek MS (BioMérieux) en el Departamento de Microbiología Clínica de la Fundación Jiménez Díaz (Madrid). Los aislados clínicos de *C. auris* fueron identificados y provistos por el Centro Nacional de Microbiología (Instituto de salud Carlos III, ISCIII, Madrid). En el estudio microbiológico del sol-gel se utilizaron las cepas *C. albicans* ATCC 10231, Cal1 y Cal 35, *C. parapsilosis* ATCC 22019, κ1 y κ4.

Cepa	Aislamiento	Tipo
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Broncomicosis	Referencia
Cal1	Catéter	Clínica
Cal2	Catéter	Clínica
Cal35	Prótesis de cadera	Clínica
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Esprue tropical	Referencia
K1	Otitis	Clínica
K2	Prótesis de rodilla	Clínica
K4	Prótesis de cadera	Clínica
<i>C. auris</i> DSM 21092	Descarga canal auditivo	Referencia, no agregativa
Cau40	Candidemia	Clínica, no agregativa
Cau63	Piel	Clínica, agregativa

Tabla 4.1. Relación de cepas utilizadas en los experimentos de la tesis.

Además, los aislados clínicos de *C. auris* fueron clasificados en fenotipo agregativo o no agregativo preparando 5 ml de una solución conteniendo una concentración de 3 McFarland (10^7 UFC/ml) en PBS. La solución se agitó vigorosamente en el vórtex

4. Materiales y métodos

durante un minuto y una gota de esta solución se depositó sobre un portaobjetos y se visualizó al microscopio óptico usando un aumento de 600x.

4.2. Caracterización de las cepas

4.2.1. Determinación de la producción de biopelículas y caracterización de su estructura mediante microscopía confocal

Para caracterizar la estructura de las biopelículas de todas las cepas se indujo su formación incubando en placas μ -slide de 8 pocillos (Ibidi, EEUU) 300 μ l por pocillo de una solución conteniendo una concentración de 0.5 McFarland (10^6 UFC/ml) de levaduras en medio inductor Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado con glutamina, 2% glucosa y tampón ácido 3-(N-morpholino) propanosulfónico (MOPS) a una concentración final de 0,165 mol/L y pH 7.0 a 37°C y 5% CO₂ durante 24, 48, 72 y 96 h en agitación suave (60 rpm). Transcurrido el tiempo necesario se retiró el medio y las biopelículas se tiñeron añadiendo a cada pocillo 300 μ l una solución de PBS conteniendo una mezcla de FUN1 10 μ M (Thermofisher, EEUU) y 25 μ g de Concanavalina A-Alexa Fluor 488 conjugate (ConA) (Thermofisher, EEUU) e incubando la placa en oscuridad durante 45 minutos en agitación suave (60 rpm).

Por una parte, FUN1 es un compuesto que interviene en una ruta bioquímica conservada en levaduras y pasa de ser una masa difusa de color amarillo/verde a formar pequeñas vacuolas de color naranja/rojo en células metabólicamente activas (Wilson 1997). Por otra parte, ConA es un compuesto que se une selectivamente a polisacáridos con residuos α -manopiranososa y α -glucopiranososa presentes en las paredes celulares de las levaduras y dando una fluorescencia verde (Gunther *et al.* 1973). Como resultado de la tinción con estos dos fluoróforos las vacuolas de un tono rojizo se localizan en las células metabólicamente activas, que tienen sus paredes teñidas en verde (**Figura 4.2**).

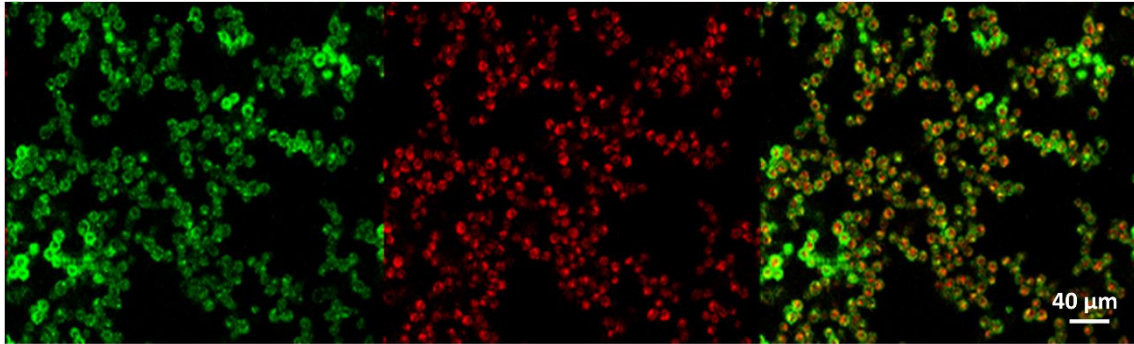


Figura 4.2. Tinción de levaduras de *C. albicans* con ConA (verde) y FUN-1 (rojo) con un aumento de 800X.

Pasado el tiempo de tinción ésta se retiró y las placas se observaron en un microscopio confocal Leica SP5 (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania), usando un aumento de 400X. En la **Tabla 4.2** se recogen las condiciones empleadas para cada fluoróforo.

Fluoróforo, láser	Excitación (nm)	Emisión (nm)
FUN-1 (Helio-Neón)	543	560
Concanavalina A 488 (Argón)	488	505

Tabla 4.2. Condiciones empleadas en la adquisición de imágenes por microscopía confocal

Por cada biopelícula se tomaron 8 fotos y se midió el espesor en 8 puntos diferentes seleccionados al azar. Las imágenes se analizaron usando el software ImageJ ([Ver Anexo I: programación](#)) y se analizó la viabilidad (fluorescencia roja del FUN-1) y el porcentaje de superficie cubierta, equivalente a la confluencia o densidad de células (fluorescencia verde de la ConA). Los datos de espesor se analizaron mediante una t-student pareada y los de superficie cubierta se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis; y el test de Mann-Whitney se usó para comparar dos a dos los resultados entre todas las cepas. En todos los análisis estadísticos se usó el programa Stata versión 14.2 (StataCorp®, EEUU).

4. Materiales y métodos

4.2.2. Cuantificación de la biomasa viable producida por las biopelículas

La biomasa viable de una biopelícula producida por especies del género *Cándida* puede definirse como la cantidad de células presentes dentro de la estructura de la biopelícula que poseen un metabolismo activo. Es una medida directa de la cantidad de biofilm producido (Van den Driessche *et al.* 2014).

En estos experimentos se empleó el compuesto Alamar Blue, cuyo ingrediente activo es la resazurina (IUPAC: 7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-ona), que es reducida a resorufina por las reductasas mitocondriales de las células eucariotas al actuar como aceptor intermedio en la cadena transportadora de electrones. De esta forma el compuesto pasa de un color azul, no fluorescente a un color rosa altamente fluorescente en la banda de 580-590 nm al ser excitado a 530-560 nm, permitiendo medir el estado metabólico de las células que se estén evaluando mediante espectroscopía de fluorescencia (Page *et al.* 1993). Varios autores han demostrado que el uso del Alamar blue ofrece unos resultados más reproducibles que el Cristal violeta y es más asequible que otros compuestos como los derivados de sales de tetrazolio (XTT, MTT), ofreciendo una reproducibilidad similar (Peeters *et al.* 2008).

Para cuantificar la biomasa viable de las biopelículas se indujo su formación incubando en una placa p96 Fluoronunc (Microwell, Thermo, EEUU) 100 µl por pocillo de una suspensión de levaduras conteniendo una concentración de 0.5 McFarland en medio RPMI y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 90 minutos para favorecer la adherencia de las levaduras. Tras esto se retiró el medio y se añadieron 200 µl de medio RPMI + 2% Glucosa + MOPS por pocillo y se incubaron las placas durante 24, 48, 72 y 96 h a 37°C y 5% CO₂. La producción de biomasa viable se determinó añadiendo tras la incubación 10 µl de Alamar Blue por pocillo e incubando la placa a 37°C durante 3 h a 60 rpm. Tras esto se midió la fluorescencia en un lector de placas Perkin Elmer EnSpire® Multimode Reader (Perkin Elmer, EEUU) usando una longitud de onda de excitación de 570 nm y una longitud de onda de emisión de 585 nm. Los experimentos se realizaron en tres replicados biológicos usando medio RPMI + 2% Glucosa + MOPS como control negativo. Los datos se normalizaron en base a este control.

Los resultados se analizaron mediante el test de Mann-Whitney con un nivel de significación estadística $p < 0.05$ usando el programa Stata.

4.2.3. Modelo in vivo de infección de *Candida auris* en *Galleria mellonella*

En estos experimentos se utilizaron las cepas *C. albicans* ATCC 10231, Cal2 y Cal35 y las cepas *C. auris* DSM 21092, Cau40 y Cau 63. Las larvas de *G. mellonella* (BioSystems Technology Ltd, Exeter, Devon, Reino Unido), que previamente habían sido mantenidas durante 24 h a 15°C, se pesaron en una balanza analítica y se seleccionaron aquellas con pesos comprendidos entre 250-350 mg. El mantenimiento de las larvas durante 24h a 15°C activa su respuesta inmune celular y humoral, aumentando la densidad de hemocitos y los niveles en hemolinfa de péptidos antimicrobianos tales como galemicina o inhibidores de metaloproteasas inducibles, responsables de la activación de la vía de la melanización (Mowlds and Kavanagh 2008). De esta forma, se evita la muerte temprana de las larvas por la infección y permite observar mejor las diferencias que produzcan las cepas en el modelo.

Tras seleccionar las larvas se prepararon soluciones conteniendo una concentración de 3 McFarland de levaduras en suero salino estéril (SS) (Braun, Alemania), y las larvas se inocularon con 10 µl de estas soluciones mediante una inyección intrahemocélica realizada a través de uno de los propodios posteriores del animal.

Por cada cepa se inocularon 10 individuos, que se mantuvieron en una placa Petri vacía a 37°C durante 5 días (**Figura 4.2**). La monitorización del modelo se llevó a cabo evaluando cada 24h larva por larva los estados de supervivencia, actividad, melanización y formación de pupa, asignando puntuaciones de acuerdo al Sistema de puntuación del índice de salud desarrollado para este modelo por Loh *et al.* (Loh *et al.* 2013) adaptado en **Tabla 4.3**.

Como control negativo se utilizó un grupo de 10 individuos sin manipular, como control de la inyección se usó un grupo de 10 individuos al que se le inocularon 10 µl de SS y como control de la reacción del sistema inmune del animal a la presencia de las levaduras inactivadas se usaron dos grupos de 10 individuos a los que se inocularon 10 µl de una solución previamente autoclavada conteniendo 3 McFarland de un aislado clínico de *C.auris* (Cau63X) o de *C. albicans* (Cal35X).

Durante todo el experimento, de cada individuo muerto se aisló la cepa originalmente inoculada y se sembró en una placa SGC2 para comprobar su viabilidad. Todos los experimentos fueron realizados en triplicado.

4. Materiales y métodos

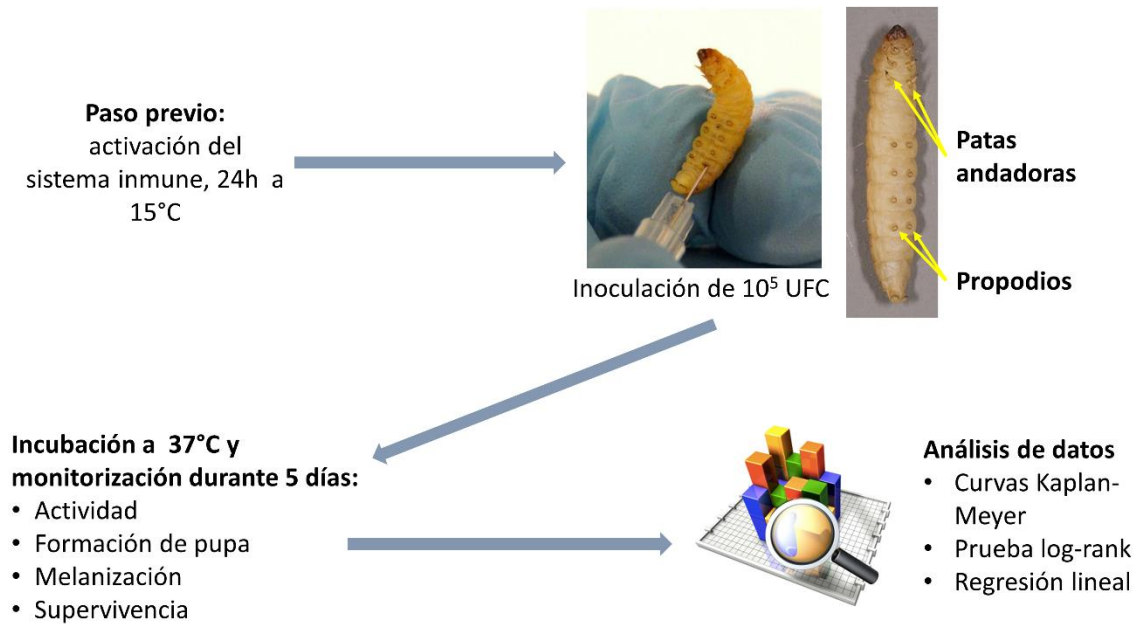


Figura 4.2. Protocolo de inoculación de *G. mellonella*.

Categoría	Descripción	Puntuación asignada
Actividad	Ninguna	0
	Mínima con estimulación	1
	Activa con estimulación	2
	Activa sin estimulación	3
Formación de pupa	No pupa	0
	Pupa parcial	0.5
	Pupa completa	1
Melanización	Completa	0
	Puntos negros sobre cutícula	1
	> 3 puntos negros/marrones sobre cutícula	2
	< 3 puntos negros/marrones sobre cutícula	3
	Sin melanización	4
Supervivencia	Viva	0
	Muerta	2

Tabla 4.3. Sistema de puntuación del modelo *in vivo* de *G. mellonella* (adaptada de Loh *et al.* 2013). Se recogen las puntuaciones asignadas a cada estado posible en las 4 categorías analizadas: actividad, formación de pupa, melanización y supervivencia.

Las puntuaciones asignadas a cada estado se multiplicaron por el número de larvas que se encontró en ese estado y se obtuvieron puntuaciones totales de supervivencia, actividad, melanización y formación de pupa. El valor que se usó en el análisis estadístico fue la suma de las puntuaciones totales de las tres réplicas. El análisis de la mortalidad se realizó mediante el test de log-rank comparando dos a dos de las curvas de Kaplan-Meyer de los distintos grupos. Los resultados de actividad, melanización y formación de pupa se evaluaron mediante regresión lineal y los resultados de la regresión se compararon dos a dos mediante una t-student pareada teniendo en cuenta la igualdad o desigualdad de las varianzas. Con el fin de obtener una representación gráfica uniforme de los resultados, las puntuaciones de cada grupo fueron transformadas a porcentajes, tomando como 100% las puntuaciones otorgadas el día 0. Un nivel de significación estadística de 0.05 fue empleado en todos los análisis, que fue realizado usando el software Stata versión 14.2 (StataCorp®, EEUU).

4.2.4. Estudio de susceptibilidad a antifúngicos

En este estudio se compararon la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima de erradicación de la biopelícula (CMEB) en todas las cepas. La CMI se define como la mínima concentración de agente antimicrobiano que en condiciones definidas inhibe el crecimiento visible de un microorganismo (Wiegand *et al.* 2008). Las CMIs se determinaron siguiendo el método de microdilución para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de antifúngicos para levaduras del Comité europeo para la sensibilidad a antimicrobianos (siglas en inglés EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (M. C. Arendrup JM 2017). Los antifúngicos seleccionados fueron anfotericina B deoxicolato (Sigma-Aldrich, EEUU), anidulafungina (obtenida a través del programa ASPIRE, Pfizer, EEUU), caspofungina, fluconazol y voriconazol (Sigma, EEUU). Las soluciones stock se prepararon en Dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración 1000 veces mayor que la máxima concentración final utilizada en los experimentos.

Brevemente, el método consiste en la exposición de una concentración conocida de levadura a diluciones seriadas de antifúngico. Se utilizaron placas transparentes de

4. Materiales y métodos

poliestireno p96 (Thermofisher, EEUU) y a cada pocillo se añadieron 100 µl de una solución conteniendo una concentración de 0.5 McFarland de levaduras y se añadieron otros 100 µl conteniendo la dilución correspondiente de antifúngico. Se utilizó medio RPMI 1640 + 2% Glucosa + MOPS tanto para preparar las soluciones de levadura como para diluir las soluciones stock de antifúngicos y preparar las diluciones seriadas. Las concentraciones finales de antifúngicos a evaluar se seleccionaron siguiendo las recomendaciones del EUCAST (anfotericina B: 0.032-16 mg/L; anidulafungina: 0.016-8 mg/L; caspofungina: 0.016-8 mg/L, fluconazol: 0.12-64 mg/L; voriconazol: 0.016-8 mg/L). Las placas se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 24 h en el caso de los experimentos realizados con las cepas de *C. albicans* y *C. auris* y 48h en el caso de los realizados con las de *C. parapsilosis*. Tras la incubación se leyó la absorbancia a 530 nm en un lector de placas Perkin Elmer EnSpire® Multimode Reader y se determinaron las CMIs teniendo en cuenta la inhibición del 90% del crecimiento por la anfotericina B y el 50% por azoles y equinocandinas. La **figura 4.3** ilustra de forma general el método utilizado.

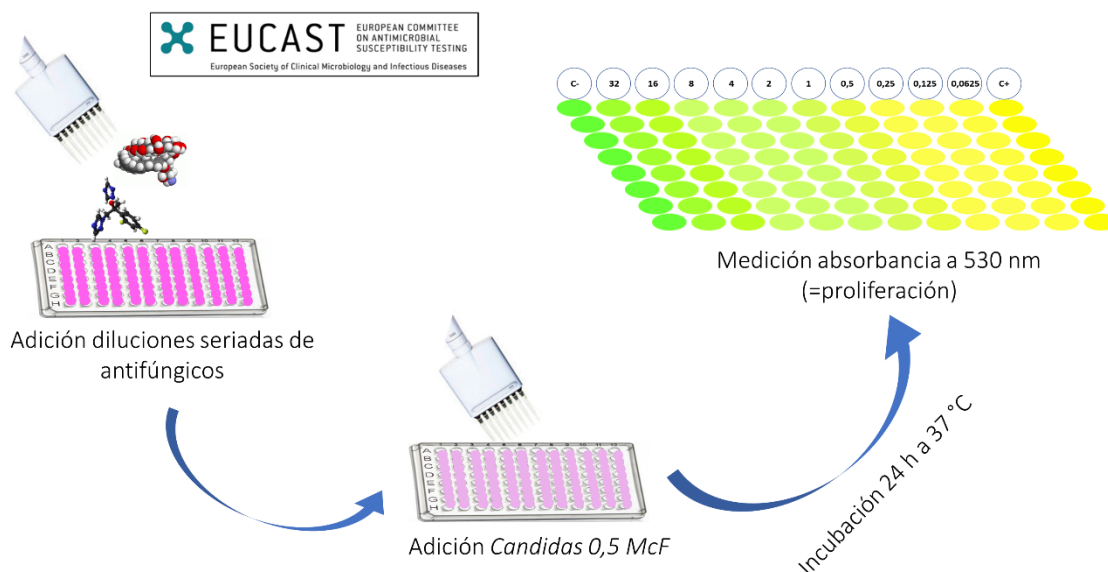


Figura 4.3. Método de microdilución para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (EUCAST). El método consiste en la exposición de una concentración conocida de levaduras a diluciones seriadas de antifúngicos durante 24-48 h y la posterior lectura de la absorbancia a 530 nm.

La interpretación de las CMI se llevó a cabo teniendo en cuenta las referencias publicadas online por el EUCAST (EUCAST 2018). Los experimentos fueron realizados en tres replicados biológicos, usando como control negativo medio RPMI 1640 + 2% Glucosa + MOPS y como controles positivos suspensiones de levaduras sin adición de antifúngico. Los resultados se normalizaron en base al control negativo.

La CMEB se define como la concentración mínima de agente antimicrobiano que es capaz de producir una reducción de la biomasa viable de biopelícula (Ceri *et al.* 1999). Para determinar las CMEBs se indujo previamente la formación de biopelículas durante 48 h en placas de poliestireno p96 Fluoronunc siguiendo el protocolo descrito en el apartado “[Determinación de la producción de biomasa viable](#)”. Se utilizaron los antifúngicos anfotericina B deoxicolato, anidulafungina, caspofungina, fluconazol y voriconazol. Las CMEBs se determinaron con una modificación del protocolo descrito previamente por Repp *et al.* (Repp *et al.* 2007). Una vez formadas las biopelículas, el medio de crecimiento se retiró usando una bomba de vacío y a cada pocillo se le añadieron 100 µl de una concentración determinada de antifúngico preparada previamente en medio RPMI + 2% Glucosa + MOPS. De forma análoga al procedimiento seguido para determinar las CMI, en cada cepa se testaron 10 concentraciones de antifúngico en un rango de 0.5 a 256 mg/L.

La placa se incubó durante 48 h a 37°C y 5% de CO₂. Tras esto, se añadieron 10 µl de Alamar Blue por pocillo y se incubó la placa durante 3 h a 80 rpm; después se midió la fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 570 nm y una longitud de onda de emisión de 585 nm en un lector Perkin Elmer EnSpire® Multimode Reader. La **figura 4.4** ilustra el método utilizado.

A fin de establecer una analogía con las CMI obtenidas en el apartado “[Determinación de la concentración mínima inhibitoria \(CMI\)](#)”, se tomó el 90% de erradicación de la biopelícula para la anfotericina B y el 50% para los azoles y equinocandinas. Los experimentos se realizaron en tres replicados biológicos usando medio RPMI + 2% Glucosa + MOPS como control negativo, y biopelículas sin adición de antifúngico como controles positivos. Los datos se normalizaron en base al control negativo.

4. Materiales y métodos

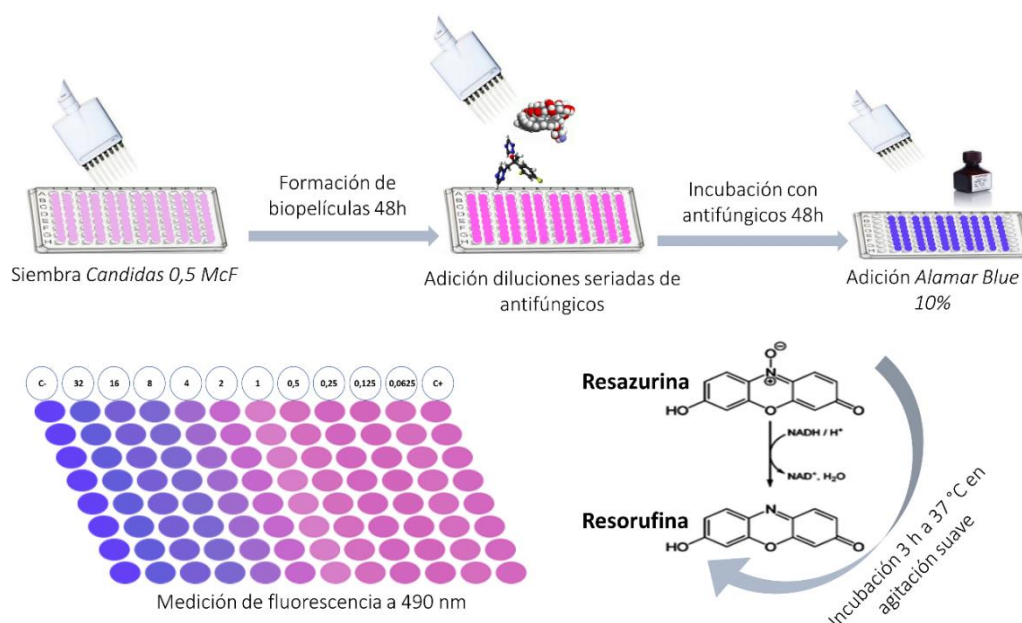


Figura 4.4. Método de microdilución para la determinación de la concentración mínima de erradicación de las biopelículas (CMEB). El método consiste en la exposición de biopelículas maduras a diluciones seriadas de antifúngicos durante 48 horas, tras lo cual se mide la actividad metabólica mediante la incubación con Alamar Blue durante 3 horas y la posterior medición de fluorescencia a 490 nm.

4.2.5. Caracterización del tratamiento de las biopelículas de *C. auris* con antifúngicos mediante microscopía confocal

El protocolo desarrollado para formar y observar las biopelículas es exactamente el mismo explicado en el apartado [“Caracterización de la estructura de las biopelículas mediante microscopía confocal”](#). Para realizar las pruebas de tratamiento con antifúngicos se retiró el medio de crecimiento de las biopelículas producidas por las cepas de *C. auris* durante 24 o 48 horas y se añadieron 300 µl de medio RPMI + 2% Glucosa + MOPS conteniendo una concentración determinada de antifúngico. Los antifúngicos empleados fueron anfotericina B deoxicolato, anidulafungina y fluconazol y las concentraciones usadas fueron 2 mg/L, 10 mg/L y 30 mg/L respectivamente (Tabla 4.4).

Antifúngico	Dosis (mg/día)	Concentración máxima en plasma (<i>C_{max}</i>) (mg/L)	Referencias
Anfotericina B deoxicolato	50	1.7	(Heinemann <i>et al.</i> 1997, Bekersky <i>et al.</i> 2002)
Anidulafungina	200	7.7	(Liu <i>et al.</i> 2013)
Fluconazol	800	28-34	(Pittrow and Penk 1997, Louie <i>et al.</i> 1998)

Tabla 4.4. Concentraciones máximas en plasma (*C_{max}*) alcanzables tras una dosis única administrada por vía intravenosa en pacientes afectados por infecciones sistémicas producidas por levaduras del género *Cándida*.

Las biopelículas se incubaron con los antifúngicos durante 24 horas en agitación suave (60 rpm) a 37°C, tras lo cual se retiró el medio y las biopelículas se tiñeron añadiendo a cada pocillo 300 µl de una solución conteniendo una mezcla de FUN1 10 µM y 25 µg de Concanavalina A (ConA) disueltos en PBS e incubando la placa en agitación suave durante 45 minutos a 37°C en oscuridad. Tras esto se retiró la tinción y las placas se observaron en un microscopio confocal Leica SP5 usando un aumento de 400X. Por cada biopelícula se tomaron 8 fotos y se midió el espesor en 8 puntos diferentes seleccionados al azar. Las imágenes se analizaron usando el software ImageJ ([Ver anexo 1: programación](#)) y se analizó la viabilidad (fluorescencia roja del FUN-1) y el porcentaje de superficie cubierta (fluorescencia verde de la ConA). Como controles se usaron biopelículas de *C. auris* crecidas durante 48 o 72 h. Los datos de espesor y superficie cubierta se analizaron con el programa Stata mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis; y el test de Mann-Whitney se usó para comparar dos a dos los resultados entre todas las cepas.

4. Materiales y métodos

4.3. Diseño y evaluación microbiológica y celular de un recubrimiento sol-gel biodegradable cargado con antifúngicos.

4.3.1. Fabricación y caracterización del sol-gel cargado con fluconazol o anidulafungina.

Los recubrimientos de tipo sol-gel fueron preparados por el grupo del departamento de ciencia e ingeniería de materiales de la Universidad Carlos III de Madrid.

El recubrimiento sol-gel organo-inorgánico híbrido se fabricó mediante la metodología de Taguchi (Mahmoodian *et al.* 2008) a partir de una mezcla de dos organopolisiloxanos: 3-metacriloxipropiltrimetoxisilano (MAPTMS) y tetrametoxisilano (TMOS) en una ratio molar 1:2. Estos sol-geles fueron funcionalizados con tris(trimetilsilil) fosfito usando una ratio molar 52:1 y con fluconazol o anidulafungina añadiéndolos a la fase acuosa durante el proceso de síntesis. El tiempo de reacción fue de 24 h y la temperatura de secado de 60°C.

Se fabricaron recubrimientos sin adición de antifúngico como control (P2) y recubrimientos cargados con tres concentraciones diferentes de fluconazol (F) o anidulafungina (A) en función del porcentaje de saturación (0%, 50%, 75% y 100%) (**Tabla 4.5**). Estas formulaciones fueron depositadas mediante dip-coating (**Figura 4.5**) sobre discos de titanio que habían sido fabricados mediante pulvimetalurgia (García-Casas *et al.* 2019).

Porcentaje de saturación (%)	Fluconazol (F)	Anidulafungina (A)
50	0,65	0,5
75	0,975	0,75
100	1,3	1

Tabla 4.5. Cantidad cargada de cada antifúngico en función del porcentaje de saturación del sol-gel. Datos en mg/ml.

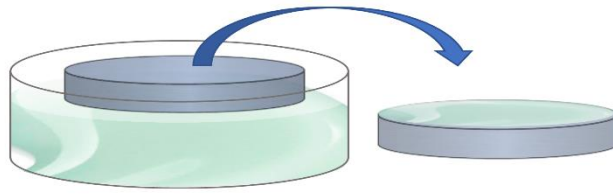


Figura 4.5. Esquema del Dip-coating. En esta técnica la pieza se sumerge por la cara a funcionalizar en el sol-gel. Después se deja curando a temperatura ambiente durante 24 h.

4.3.2. Estudio de la adherencia de levaduras al sol-gel

Para este estudio, se recubrió la base de un pocillo de una placa de poliestireno P6 (Sigma, EEUU) con 100 μ l de sol-gel (P2) y se curó a temperatura ambiente durante 24 h. Después, al pocillo se añadieron 3 ml de una solución conteniendo 0.5 McFarland de levaduras en SS y la placa se incubó durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂. Tras la incubación se estimó la cantidad de levaduras no adheridas mediante absorbancia a 530 nm. Los pocillos se lavaron dos veces con 2 ml de SS, se añadieron otros 2 ml de SS al pocillo y la placa se sonicó durante 5 minutos a 60 Hz. Tras la sonicación se estimaron las levaduras adheridas al recubrimiento mediante el método de *drop plate*, usando 7 diluciones seriadas de factor 10. Como control positivo se realizó el experimento en los pocillos de la placa sin adición de sol-gel.

Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron usando el test de Mann-Whitney con un nivel de significación estadística de 0.05.

4.3.3. Estudio de prevención de la formación de biopelículas sobre piezas de Titanio recubiertas con sol-gel cargado con fluconazol y anidulafungina

Los discos de Ti recubiertos con P2 ó P2 + las distintas concentraciones de antifúngico (F50, F75, F100, A50, A75 y A100) se introdujeron en pocillos de placas de poliestireno P12 (Thermofisher, EEUU). A cada pocillo se le añadió una solución conteniendo una concentración 0.5 McFarland de levaduras en medio RPMI + 2% Glucosa + MOPS y la placa se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 24 o 48 h dependiendo de si la cepa evaluada era *C. albicans* o *C. parapsilosis* (**Fig. 4.6A**). Tras la incubación, por una parte, se

4. Materiales y métodos

retiraron los discos de los pocillos, se lavaron tres veces en SS y se retiró el recubrimiento mediante scrapping -o raspado- (Mandakhalikar *et al.* 2018) (**Fig. M5C**) usando depresores linguales esterilizados como rascados, que fueron posteriormente sonicados en 10 ml de SS durante 5 min a 60 Hz (**Fig. 4.6D**). Tras esto, se estimaron las UFC/cm² mediante drop-plate usando 7 diluciones seriadas de factor 10 (**Fig. 4.6E**).

Por otra parte, las levaduras no adheridas al sol-gel presentes en el medio de crecimiento se estimaron mediante absorbancia a 530 nm usando como control negativo medio RPMI + 2% Glucosa + MOPS (**Fig. 4.6B**). Los resultados de absorbancia se normalizaron en base al control negativo.

Los experimentos se realizaron en triplicado. Los resultados se analizaron mediante el test de Mann-Whitney con un nivel de significación estadística de 0.05.

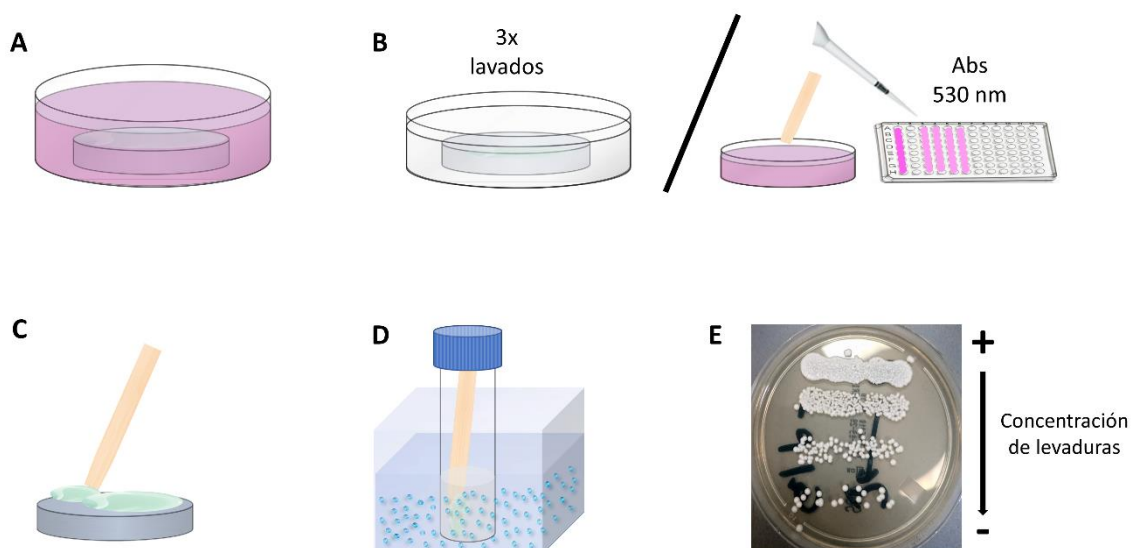


Figura 4.6. Protocolo realizado para evaluar la prevención de la formación de biopelículas sobre los distintos recubrimientos.

4.3.4. Estudio del tratamiento de biopelículas con el sol-gel cargado con fluconazol o anidulafungina mediante el método de Calgary

En estos experimentos se inocularon, en placas p96 Fluoronunc, 200 µl por pocillo de una solución conteniendo 0.5 McFarland de levaduras en medio RPMI + 2% Glucosa + MOPS. Las placas se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 48 horas para inducir la formación de biopelículas (**Fig. 4.7A**). Tras esto, la tapa de la placa se reemplazó por la

tapa de incubación de biopelículas MBEC™ inoculator (Innovotech, Canadá) en cuyas proyecciones se habían depositado 24 horas antes los distintos tratamientos: P2, F50, F75, F100, A50, A75 y A100. El recubrimiento de las proyecciones se realizó sumergiéndolas en pocillos conteniendo 200 µl de los sol-geles. Una vez cambiada la tapa se incubó la placa en agitación suave a 37°C durante 48 h (**Fig. 4.7B**), y después se retiró la tapa MBEC™ inoculator, se añadieron 10 µl de Alamar blue por pocillo y la placa se incubó en agitación suave durante 3 horas a 37°C en oscuridad (**Fig. 4.7C**). Por último, se estimó la viabilidad metabólica de las biopelículas mediante espectroscopía de fluorescencia usando una longitud de onda de excitación de 570 nm y una longitud de onda de emisión de 585 nm (**Fig. 4.7D**).

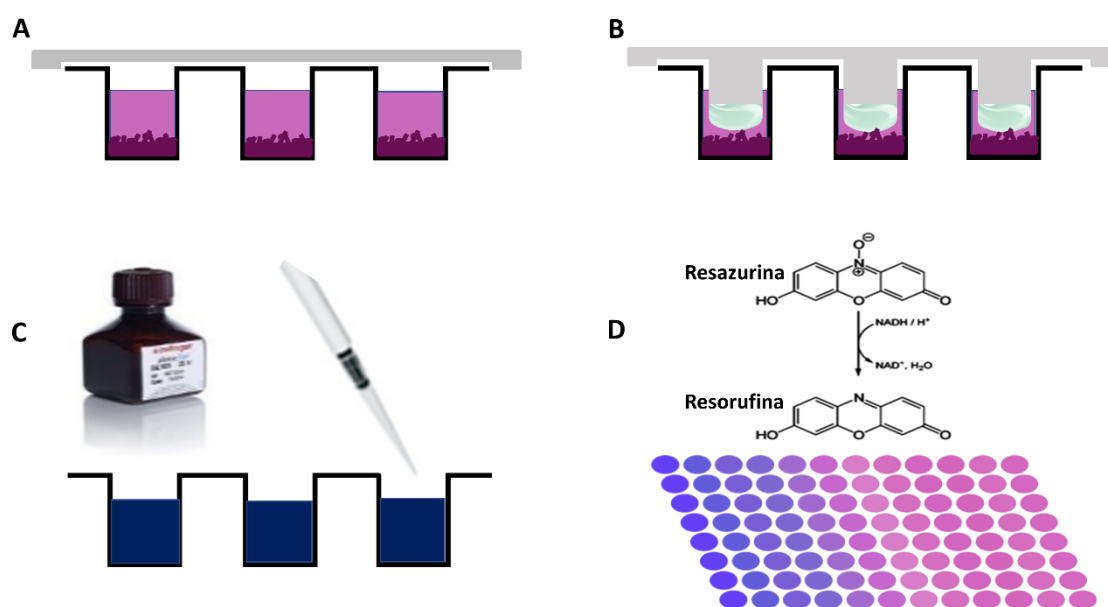


Figura M6. Método modificado de Calgary. Protocolo realizado para la evaluación del tratamiento de biopelículas maduras con los distintos recubrimientos.

Como controles positivos se usaron biopelículas sin tratar y como control negativo medio RPMI +2 % Glucosa + MOPS. Los resultados se normalizaron en base al control negativo primero, y después se transformaron en el porcentaje de aumento o reducción de biomasa viable respecto al control positivo. Los experimentos se realizaron en triplicado. Los resultados se analizaron mediante el test de Mann-Whitney con un nivel de significación estadística de 0.05.

4. Materiales y métodos

4.3.5. Evaluación celular del sol-gel

Se seleccionaron células MC3T3-E1 de osteoblastos de ratón con las que se realizaron ensayos de citotoxicidad y proliferación en presencia del sol-gel. Las células se sembraron a una concentración de 10,000 células/cm² en placas p96 con medio α -mínimo esencial (α -MEM, Invitrogen, Thermofisher Scientific Inc. EEUU), 10% suero fetal bovino (FBS) y 1% penicilina-estreptomicina, y fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂ toda la noche. Tras la adherencia de las células el medio fue reemplazado por medio α MEM + 50 mg/ml ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, EEUU) + 10 mM β -glicerol-2-fosfato (Sigma-Aldrich, EEUU) para promover la diferenciación de los osteoblastos, y la tapa de la placa se cambió por la tapa de incubación de biopelículas MBEC™ cuyas proyecciones se habían recubierto con los distintos tratamientos: P2, F50, F75, F100, A50, A75 y A100. La placa se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 48 h y después se determinó la citotoxicidad de los recubrimientos usando el kit de ensayo de citotoxicidad no radioactiva CytoTox 96® (Promega, EEUU). La proliferación celular se estimó mediante la adición de Alamar Blue® (Bio-Rad, EEUU) al 10% (V/V) al cultivo celular tras 48 h de crecimiento y midiendo la intensidad de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 540 nm y una longitud de emisión de 600 nm en un lector Tecan Infinite 200 (Life Sciences, Suiza).

5. Resultados

5.1. Caracterización de la formación de biopelículas y evaluación de la patogenicidad

5.1.1. Evaluación de la producción de biopelículas mediante microscopía confocal

Todas las cepas evaluadas mostraron la capacidad de formar una biopelícula a 37°C y 5% de CO₂. Las biopelículas formadas en 24 h por las cepas de *C. albicans* estaban formadas principalmente por grupos de blastoconidias redondeadas, rodeadas por pequeñas cantidades de matriz extracelular (**Fig. 5.1A**). A medida que fueron madurando las biopelículas, éstas crecieron en superficie a la vez que aumentó la producción de matriz extracelular, así como el empaquetamiento y la viabilidad (densidad de levaduras metabólicamente activas) (**Fig. 5.4A**). A las 48 h comenzaron a observarse en las preparaciones de las cepas Cal1 y Cal35 la presencia de blastosporas más alargadas como resultado de la formación de tubos germinales (**Figura 5.1B**), que a las 72 h culminó en la formación de un micelio compuesto por hifas y pseudohifas (**Fig. 5.1C**) y en el resto de cepas solo se observó un aumento del empaquetamiento de las blastosporas. A las 96 h las biopelículas comenzaron a perder viabilidad y matriz extracelular como consecuencia del agotamiento de los nutrientes del medio, llegando a niveles similares a los observados en las biopelículas de 24 h (**Fig. 5.4A**) y mostrando en algunos casos signos de pérdida de integridad (**Fig. 5.1D**).

Las biopelículas de *C. albicans* mantuvieron el espesor constante durante la duración del experimento, a excepción de las producidas por la cepa Cal35, que aumentaron significativamente su espesor entre las 48 y las 72 h, sin cambios significativos en la viabilidad y la superficie.

Por su parte, las biopelículas producidas por las cepas de *C. parapsilosis* mostraron pequeños grupos de blastoconidias rodeadas de poca matriz extracelular en las primeras 24 h (**Fig. 5.2A**), cuya densidad aumentó significativamente a partir de las 48 h a la par que la viabilidad y el espesor (**Figs. 5.4B**). A las 48 h, en las cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019, κ 1 y κ 2, comenzaron a observarse procesos de gemación y algunas pseudohifas ya formadas (**Fig. 5.2B**) que alcanzaron su máximo desarrollo a las

5. Resultados

72 h (**Fig. 5.2C**). Las cepas $\kappa 2$ y $\kappa 4$ no mostraron un aumento significativo de espesor, viabilidad o matriz extracelular, y solo la cepa $\kappa 2$ manifestó un ligero aumento de estas características a las 48 h, coincidiendo con la máxima presencia de pseudohifas en su preparación (**Fig. 5.4B**). Al contrario que lo observado con las cepas de *C. albicans*, las biopelículas producidas por las cepas de *C. parapsilosis* no mostraron signos de pérdida de integridad a las 96 h, e incluso continuó aumentando la viabilidad, como en el caso de la cepa $\kappa 1$.

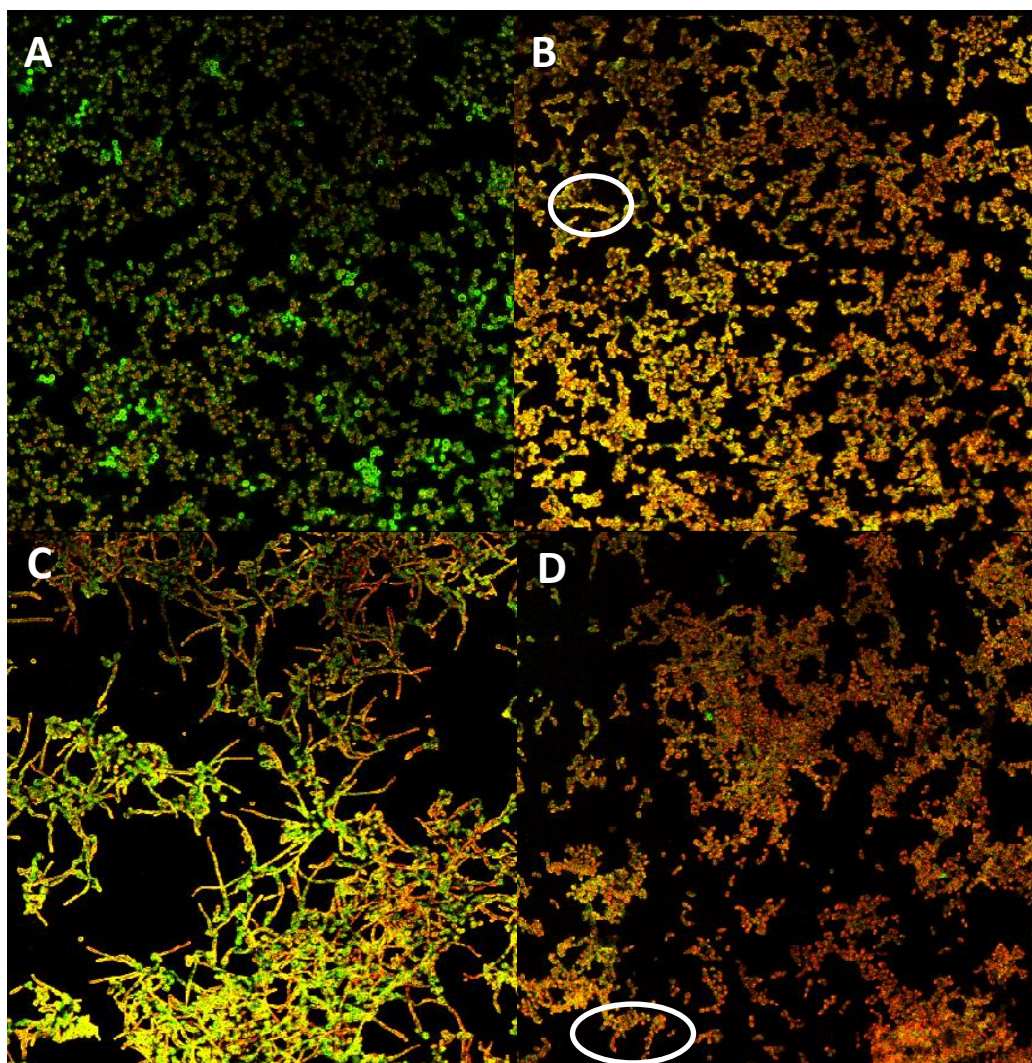


Figura 5.1. Formación de biopelículas de *C. albicans* a 24 (A), 48 (B), 72 (C) y 96 (D) horas. Puede observarse el aumento del empaquetamiento y de la viabilidad (aumento de la fluorescencia roja) a las 48 h. Además, comienza a observarse la formación de tubos germinativos en algunas zonas (círculo blanco). A las 72 h se observa el micelio producido a partir de los tubos germinativos, formado principalmente por hifas y pseudohifas. La biopelícula de 96 h comienza a mostrar signos de pérdida de integridad como la disminución

de la cohesión y la densidad de las blastoconidias. También se pueden observar algunos elementos filamentosos (círculo blanco).

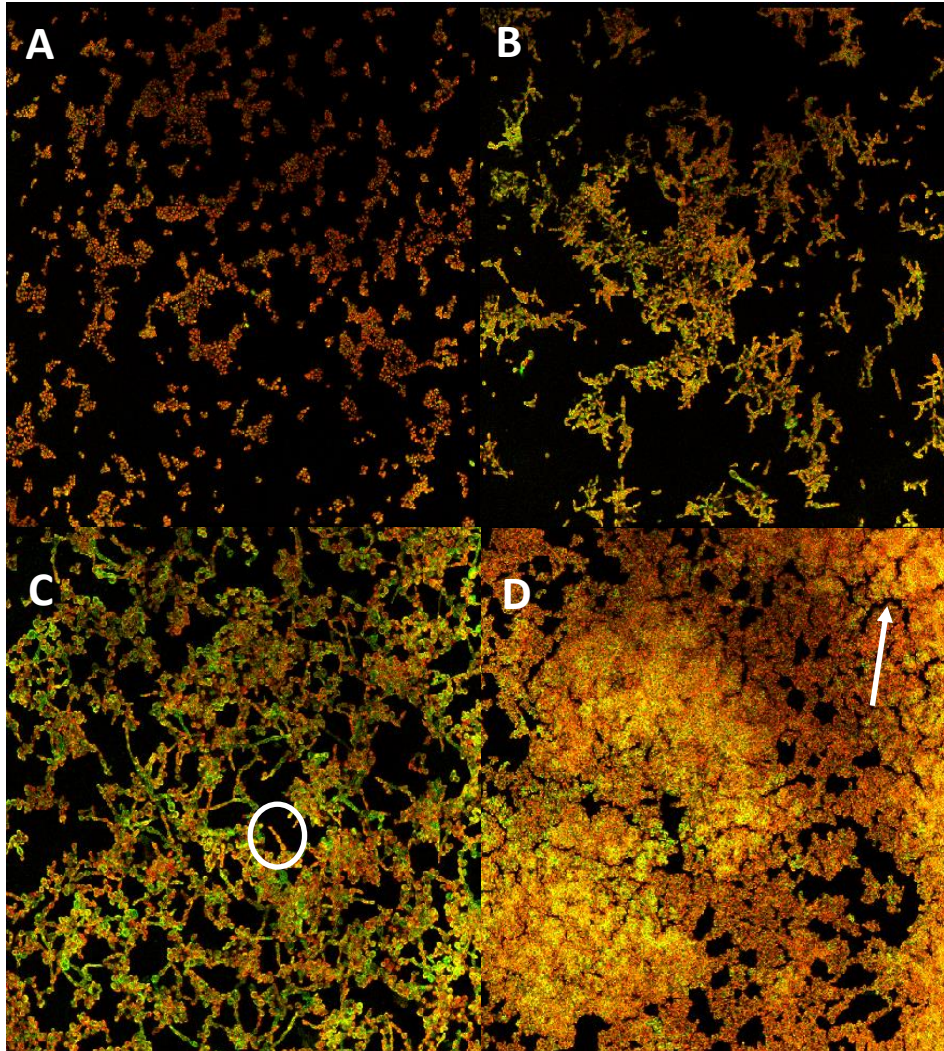


Figura 5.2. Formación de biopelículas de *C. parapsilosis* a 24 (A), 48 (B), 72 (C) y 96 (D) horas. Puede observarse la formación de microcolonias en las primeras 24 h, que a partir de las 48 h comienzan a confluir a la vez que aumenta el empaquetamiento y la viabilidad de las blastoconidias. A las 48 h se observa también la formación de algunas pseudohifas, siendo éstas más abundantes en las biopelículas de 72 h, donde pueden diferenciarse las divisiones incompletas de citoplasma (círculo blanco). Las biopelículas de 96 h no muestran elementos filamentosos y están constituidas por grandes cantidades de blastoconidias empaquetadas en matriz extracelular. Pueden observarse los canales de transporte de agua y nutrientes propios de una biopelícula madura (flecha).

5. Resultados

En el caso de las cepas de *C. auris*, éstas produjeron biopelículas compuestas por blastoconidias que no desarrollaron elementos filamentosos en ningún momento. Los cambios más notables observados durante su desarrollo (**Fig. 5.3A-D**) fueron el aumento de la viabilidad y el empaquetamiento de las blastoconidias (**Fig. 5.4C**), más marcado en la cepa agregativa Cau63, que también creció en superficie entre las 24 y las 72 h. Todas las cepas sufrieron una caída brusca de viabilidad, superficie cubierta y, en el caso de la cepa *C. auris* DSM 21092, espesor entre las 72 y las 96 h debido al agotamiento de nutrientes.

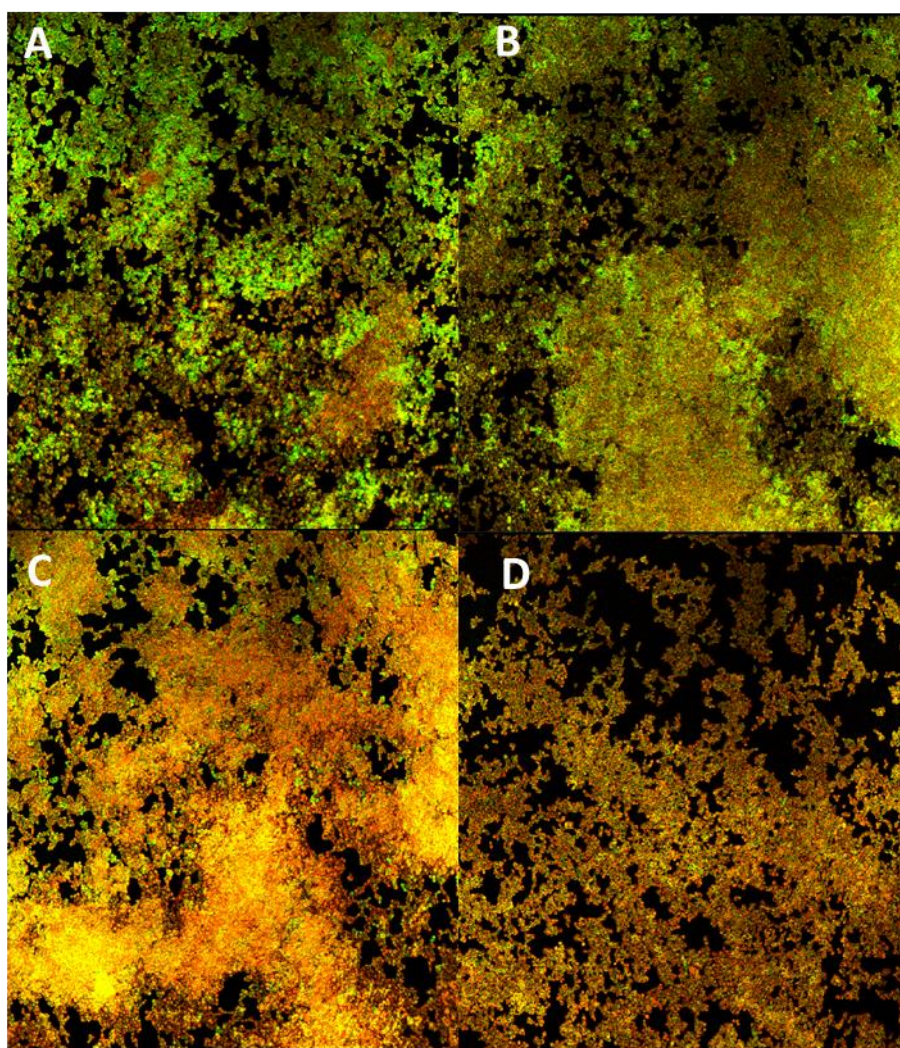


Figura 5.3. Formación de biopelículas de *C. auris* a 24 (A), 48 (B), 72 (C) y 96 (D) horas. Puede observarse el incremento en viabilidad entre las 48 y las 72 h debido a la acumulación de blastoconidias metabólicamente activas (aumento de la fluorescencia roja). A las 96 h todas las biopelículas mostraron una tendencia a disminuir su viabilidad y confluencia, mostrando campos donde las blastoconidias comienzan a estar menos empaquetadas.

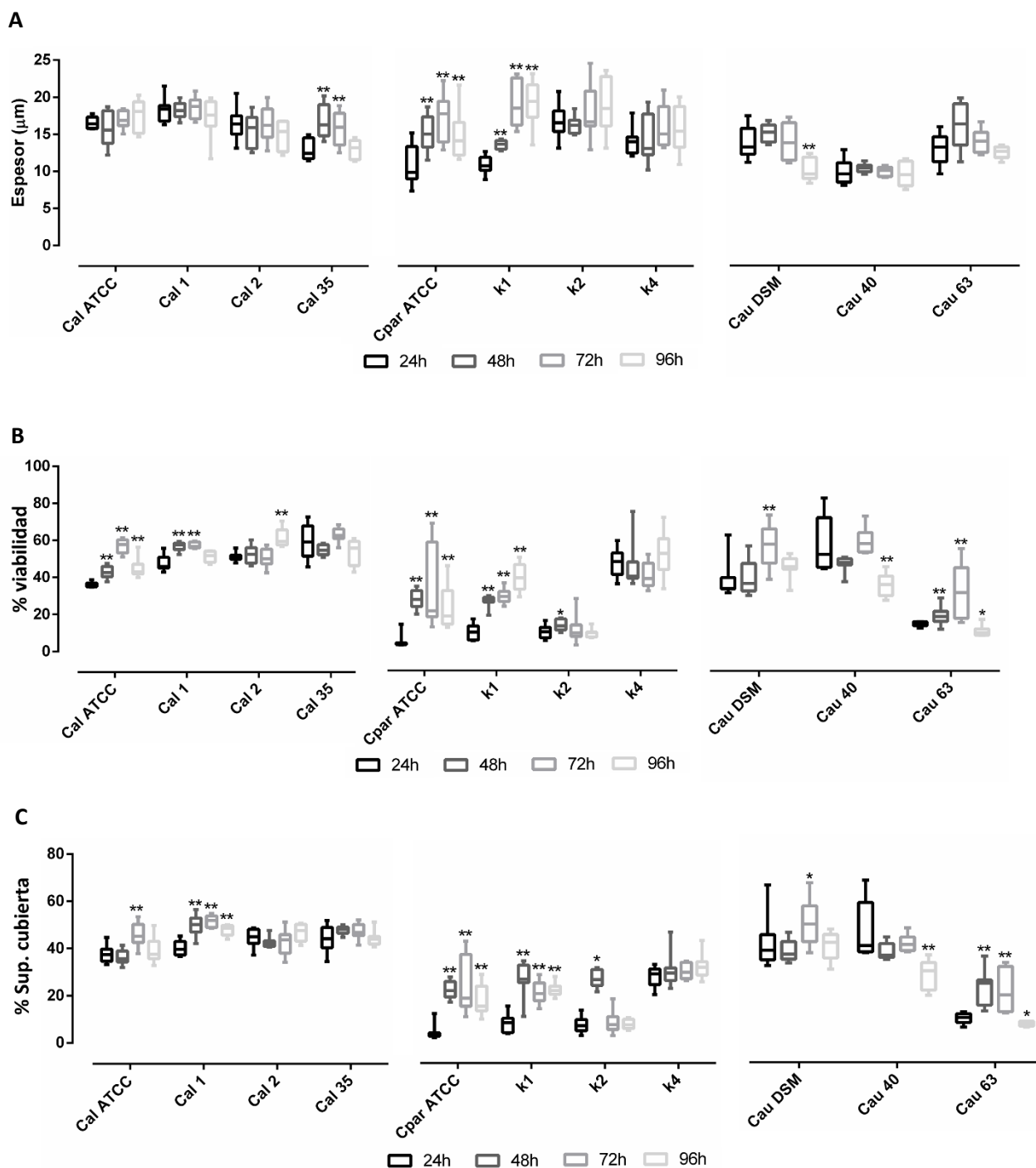


Figura 5.4. Monitorización de la evolución del espesor (A), la viabilidad (B) y la superficie cubierta (C) de las biopelículas producidas por todas las cepas empleadas. Datos representados como media \pm desviación estándar. *: $0.05 > P > 0.01$; **: $P < 0.01$.

De forma adicional a estos resultados, se establecieron comparaciones interespecíficas para evaluar globalmente las diferencias en la formación de biopelículas entre ellas

5. Resultados

(Fig. 5.5). Así, las cepas de *C. albicans* y las de *C. parapsilosis* produjeron las biopelículas de mayor espesor ($P=0.4807$) con un espesor medio de 16 μm , en contraste con las producidas por las cepas de *C. auris*, que alcanzaron los 12.5 μm ($P=0.008$). Además, las biopelículas producidas por las cepas de *C. albicans* fueron las que alcanzaron los mayores valores de viabilidad y confluencia ($P=0.0001$), mientras que las producidas por cepas de *C. parapsilosis* produjeron los valores más bajos.

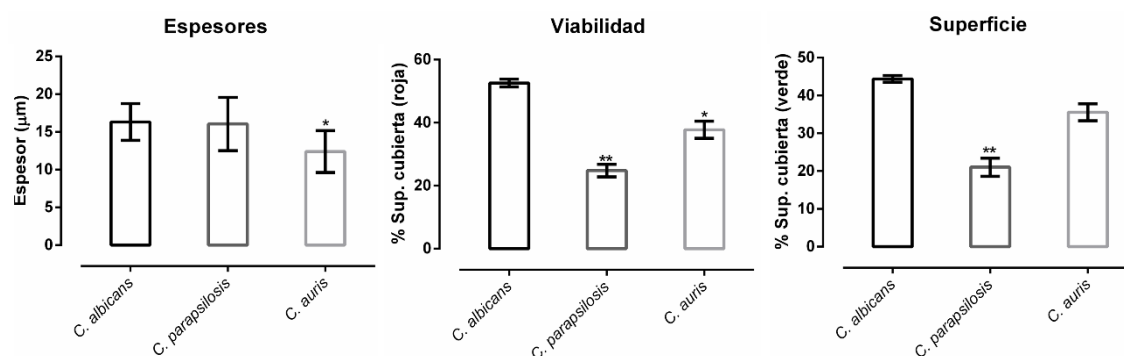


Figura 5.5. Comparación Inter especie del espesor, viabilidad y superficie cubierta global. Datos representados como media \pm desviación estándar. *: $0.05 > P > 0.01$; **: $P < 0.01$.

5.1.2. Cuantificación de la biomasa viable producida por las biopelículas

Los resultados obtenidos en el estudio de la evolución de la producción de biomasa viable fueron consistentes con los obtenidos en el análisis por microscopía confocal. Todas las cepas mostraron un aumento significativo de biomasa entre las 48 h y las 72 h, y que las 96 h comenzó a disminuir debido al agotamiento de nutrientes del medio.

Globalmente, todas las cepas clínicas produjeron más cantidad de biopelícula que las cepas de referencia, y comparando entre especies las cepas de *C. albicans* fueron las que produjeron mayor cantidad, mientras que las de *C. auris* fueron las que menos produjeron (Figura 5.6).

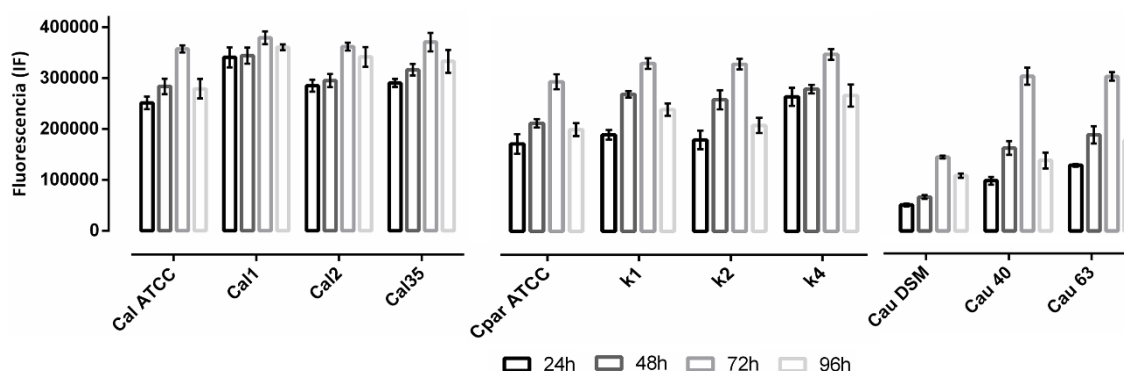


Figura 5.6. Evolución de los niveles de biomasa viable producida por todas las cepas desde las 24 a las 96 horas. Datos representados como media \pm desviación típica de la intensidad de fluorescencia (IF) obtenida al revelar los experimentos con Alamar Blue.

5.1.3. Modelo *in vivo* de infección en *Galleria mellonella*

No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las características evaluadas en el modelo entre el grupo de larvas sin manipular y el grupo al que se le había inyectado SS para evaluar el efecto de la inyección en los animales ($P=0.542$).

Evaluación de la supervivencia: En general, las cepas de aislados clínicos fueron las más virulentas en comparación con las cepas de referencia independientemente de la especie evaluada. En el modelo de infección por *C. auris*, todas las cepas produjeron una virulencia significativa en comparación con los controles ($P=0.0001$), con la cepa de referencia *C. auris* DSM 21092 matando el 20% de las larvas y las cepas clínicas Cau40 y Cau63 el 30% y 33% respectivamente (**Fig. 5.7A**). No se encontraron diferencias significativas entre la virulencia de las cepas clínicas en función de su fenotipo (agregativo o no), así como entre los controles y la cepa autoclavada Cau63X ($P=0.402$).

En el modelo de infección de *C. albicans*, la infección con las cepas *C. albicans* ATCC 10231 ($P=0.246$) y la cepa autoclavada Cal35X ($P=0.575$) no produjo una virulencia significativa y la supervivencia final de las larvas fue cercana al 80%; mientras que la infección con las cepas clínicas Cal2 y Cal35 produjo la muerte del 47% y el 77% de las larvas respectivamente ($P=0.0001$ para ambas cepas) (**Fig. 5.7B**).

5. Resultados

Evaluación de la actividad: En el modelo de infección de *C. auris* todas las cepas evaluadas produjeron bajadas significativas de la actividad durante la infección. En este caso la cepa clínica agregativa Cau63 redujo la actividad en un 18% ($P=0.0082$), mientras que la cepa de referencia *C. auris* DSM 20192 y la cepa clínica Cau40, ambas no agregativas, redujeron la actividad en un 38% y un 32% respectivamente ($P=0.027$ y $P=0.0145$) (**Fig. 5.7C**).

En el modelo de infección por *C. albicans*, solo las cepas clínicas Cal2 y Cal35 produjeron disminuciones significativas de la actividad, reduciéndola en un 66% y un 63% respectivamente ($P=0.0001$). (**Fig. 5.7D**).

Evaluación de la melanización: En la evaluación de este parámetro los grupos control no produjeron un aumento significativo ($P=0.811$).

En el modelo de infección por *C. auris* se obtuvieron diferencias significativas respecto a los controles en los grupos infectados con la cepa no agregativa Cau40 ($P=0.05$), la cepa agregativa Cau63 ($P=0.001$) y su homóloga autoclavada Cau63X (0.004), aumentando la melanización entre el 16 y el 21% con respecto a los controles (**Fig. 5.7E**). No hubo diferencias significativas entre los controles y la cepa de referencia *C. auris* DSM 21092 ($P=0.7257$).

En el modelo de infección por *C. albicans* todas las cepas evaluadas produjeron un aumento de la melanización de entre el 10 y el 16% en comparación con los controles ($P<0.05$), excepto la cepa autoclavada Cal35X, que no produjo un incremento significativo ($P=0.5276$) (**Fig. 5.7F**).

Evaluación de la formación de pupa: Los grupos control evidenciaron una mayor formación de pupa en comparación al resto ($P<0.05$).

En el modelo de infección por *C. auris* los dos aislados clínicos Cau40 ($P=0.0495$) y Cau63 ($P=0.017$) produjeron una disminución significativa de la formación de pupa (**Fig. 5.7G**), mientras que en el modelo de infección por *C. albicans* fueron las cepas Cal35 ($P=0.0083$) y su homóloga autoclavada Cal35X ($P=0.0118$) las que la produjeron (**Fig. R3H**).

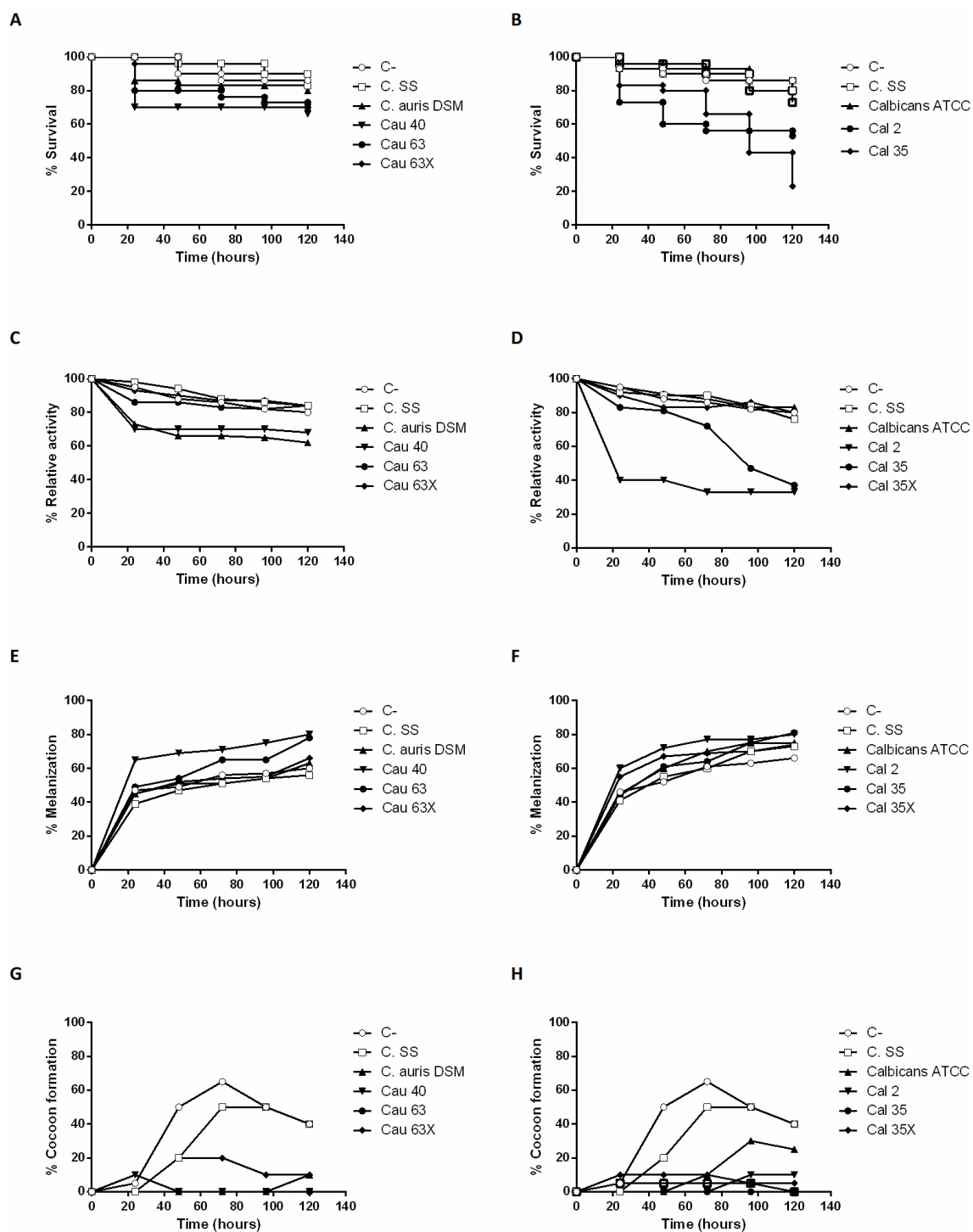


Figura 5.7. Evaluación del modelo de infección en *G. mellonella*. Se representan los porcentajes de supervivencia (A, B), actividad (C, D), melanización (E, F) y formación de pupa (G, H) obtenidos durante la evaluación durante 5 días de larvas infectadas con cepas de *C. auris* y *C. albicans*.

5. Resultados

5.1.4. Determinación de la susceptibilidad a antifúngicos

Las CMI's obtenidas se recogen en la **Tabla 5.1**. Éstas se interpretaron teniendo en cuenta las tablas de puntos de corte publicadas en la página web del EUCAST (EUCAST 2018). Los resultados de la interpretación se recogen en la **Tabla 5.2**. Las cepas de *C. albicans* fueron sensibles a todos los antifúngicos evaluados, mientras que las cepas de *C. parapsilosis* evidenciaron una mayor tolerancia a las equinocandinas. Por su parte, las cepas clínicas de *C. auris* Cau40 y Cau63 fueron resistentes a fluconazol, presentando altas CMI's para este compuesto (16 y 64 mg/L respectivamente).

CMI	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Cal 1	Cal 2	Cal 35	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	κ1	κ2	K4	<i>C. auris</i> DSM 21092	Cau 40	Cau 63
Anfotericina B	0.5	0.063	0.5	0.25	0.5	0.25	0.063	0.063	0.5	0.5	1
Anidulafungina	0.032	0.016	0.016	0.016	0.125	0.25	1	2	0.125	0.25	0.125
Caspofungina	0.5	0.063	0.016	0.063	2	4	4	2	0.25	0.5	0.25
Fluconazol	0.125	<0.125	<0.125	<0.125	0.25	0.25	1	0.5	4	16	64
Voriconazol	0.125	0.063	0.032	0.063	0.063	0.25	0.25	0.125	0.5	0.5	0.5

Tabla 5.1 Concentraciones mínimas inhibitorias. Valores representados en mg/L obtenidos en un mínimo de tres replicados biológicos.

	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Cal 1	Cal 2	Cal 35	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	κ1	κ2	K4	<i>C. auris</i> DSM 21092	Cau 40	Cau 63
Anfotericina B	S	S	S	S	S	S	S	S	PD	PD	PD
Anidulafungina	S	S	S	S	RI	RI	RI	RI	PD	PD	PD
Caspofungina	S ¹	S ¹	S ¹	S ¹	RI ¹	RI ¹	RI ¹	RI ¹	PD	PD	PD
Fluconazol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Voriconazol	RI	S	S	S	S	RI	RI	S	PD	PD	PD

Tabla 5.2. Interpretación de las CMI obtenidas. S= sensible; R= resistente; RI= resistente intermedio; PD= por determinar, esta designación indica que no existen oficialmente puntos de corte publicados por el EUCAST para esta especie.

¹. La interpretación de los resultados de caspofungina se realizó en base a las CMI's obtenidas con la anidulafungina. La recomendación del EUCAST en este aspecto es que la cepa debe considerarse susceptible a caspofungina si es susceptible a anidulafungina. Esta medida es válida hasta que se hayan establecido unos puntos de corte fiables para la caspofungina, debido a que existe una variación significativa entre los resultados obtenidos por los laboratorios oficiales.

Las CMEBs obtenidas se recogen en la **Tabla 5.3**. Estas concentraciones fueron en general muy superiores a las CMI, alcanzando valores 8000 veces mayores en el caso de las obtenidas con el fluconazol en la cepa clínica de *C. albicans* Cal2, que pasó de tener una CMI de 0.032 mg/L a una CMEB superior a 256 mg/L. La anfotericina B fue el único antifúngico que, mostró actividad frente a las biopelículas, salvo en la cepa clínica Cal35 y las cepas de *C. auris*, que aumentaron entre 32 y 512 veces el valor de las CMI.

MBEC	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Cal 1	Cal 2	Cal 35	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	κ1	κ2	K4	<i>C. auris</i> DSM 21092	Cau 40	Cau 63
Anfotericina B	1	0.5	1	8	0.5	0.25	0.25	0.25	>128	>256	>256
Anidulafungina	8	32	32	32	32	32	32	32	8	64	64
Caspofungina	32	64	32	64	32	64	64	128	64	64	64
Fluconazol	>256	>256	>256	>256	>256	>256	128	4	>256	>256	256
Voriconazol	>256	>256	>256	>256	128	>256	128	4	>256	>256	>256

Tabla 5.3. Concentraciones mínimas de erradicación de la biopelícula (CMEB). Valores expresados en mg/L obtenidos en un mínimo de tres replicados biológicos.

5.1.5. Caracterización del tratamiento de las biopelículas de *C. auris* con antifúngicos conocidos mediante microscopía confocal

Debido a la caída en espesor, viabilidad y superficie cubierta descrita en los análisis de las biopelículas sin tratar a las 96 h por el agotamiento de los nutrientes del medio, se optó por analizar los resultados del tratamiento de *C. auris* usando como controles las biopelículas crecidas durante 48 y 72 h.

En la cepa de referencia *C. auris* DSM 21092, el tratamiento de las biopelículas de 24 y 48 h con cualquiera de los tres antifúngicos produjo una disminución significativa del espesor, la viabilidad y el porcentaje de superficie cubierta (**Fig. 5.8A**). Los efectos de los tratamientos sobre el espesor fueron menores en las biopelículas de 48 h y sin embargo disminuyeron en mayor medida la viabilidad y la confluencia. En ambos casos la anidulafungina fue el antifúngico que más efecto tuvo.

5. Resultados

En el caso de la cepa clínica Cau40 (**Fig. 5.8B**) ningún tratamiento afectó al espesor de las biopelículas, y además los tratamientos con anidulafungina y fluconazol tuvieron un efecto paradójico, causando un incremento significativo en el espesor. Al igual que en la cepa de referencia, los tratamientos sí disminuyeron significativamente la viabilidad y la superficie cubierta de las biopelículas, siendo la anidulafungina el más efectivo.

Por último, los tratamientos de las biopelículas producidas por la cepa clínica agregativa Cau63 (**Fig. 5.8C**) tuvieron efectos más diversos: la anfotericina B disminuyó el espesor y la superficie cubierta de las biopelículas de 24 y 48 h, produciendo una disminución significativa de la viabilidad en éstas últimas. El tratamiento con anidulafungina no afectó a los espesores, pero sí produjo una marcada caída de la viabilidad y la confluencia de las biopelículas de 24 h.

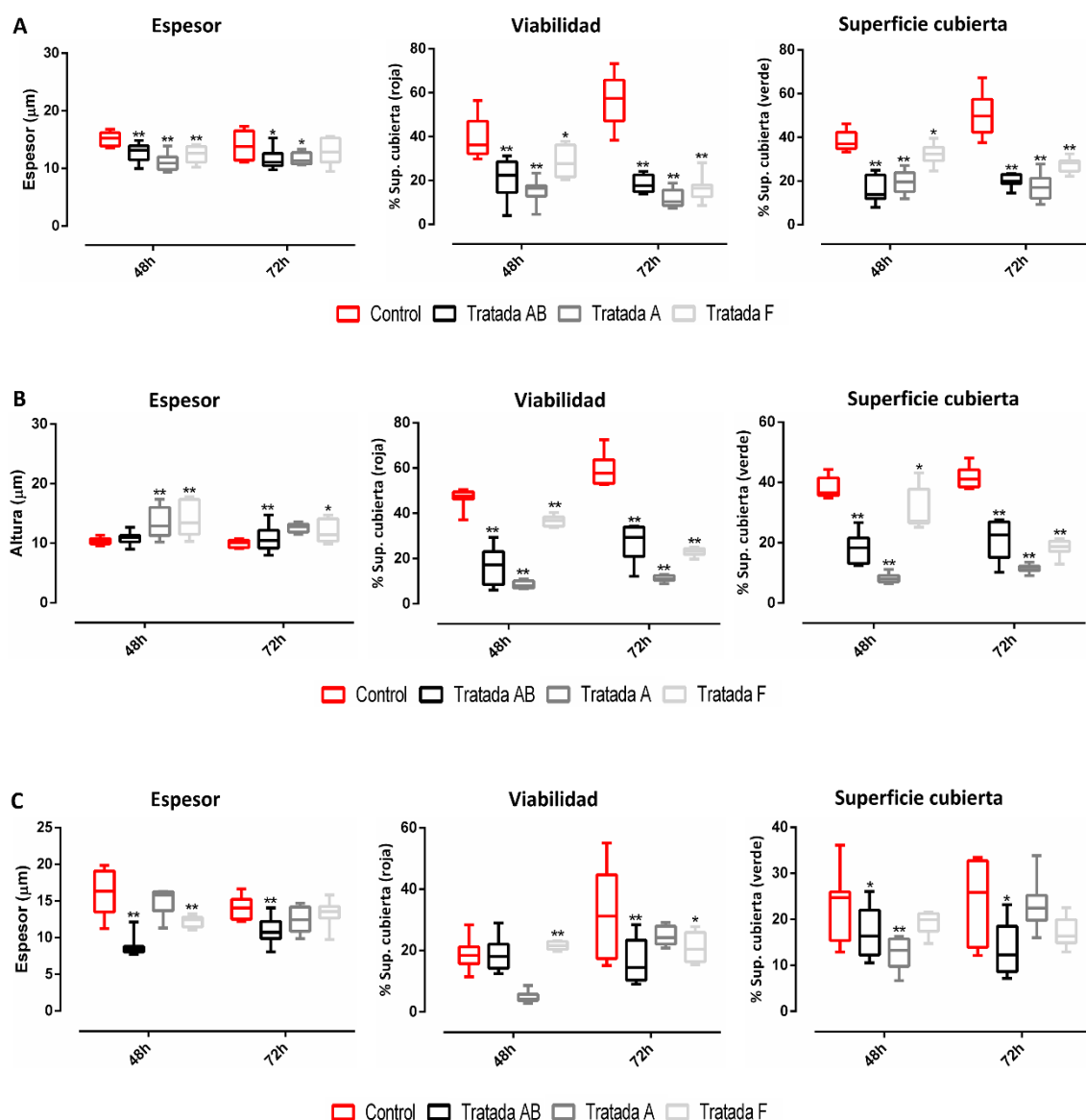


Figura 5.8. Efecto del tratamiento de biopelículas producidas por las cepas *C. auris* DSM 20192 (A), Cau40 (B) y Cau63 (C) durante 24 h o 48 h con anfotericina B, anidulafungina o fluconazol durante 24 h. Como controles se usaron biopelículas crecidas durante 48 y 72 h. Datos representados como media \pm desviación estándar para los espesores y como mediana y rango intercuartílico para la viabilidad y la superficie cubierta. *: $0.05 > P > 0.01$; **: $P < 0.01$.

5.2. Evaluación del sol-gel cargado con antifúngicos

5.2.1. Estudio de adherencia de las levaduras al recubrimiento sol-gel

La presencia del recubrimiento sol-gel sin carga de antifúngicos (P2) disminuyó significativamente la adherencia de levaduras de las cepas de *C. albicans* entre un 24% y un 34% ($P=0.0495$) (**Figura 5.9**). Sin embargo, en la cepa de referencia *C. parapsilosis* no hubo ningún efecto significativo ($P=0.1266$), y en las cepas clínicas $\kappa 1$ y $\kappa 4$ promovió la adherencia de entre 39 y 65 veces más levaduras ($P=0.04$).

No hubo diferencias significativas en las levaduras planctónicas no adheridas al recubrimiento o a la placa ($P=0.771$).

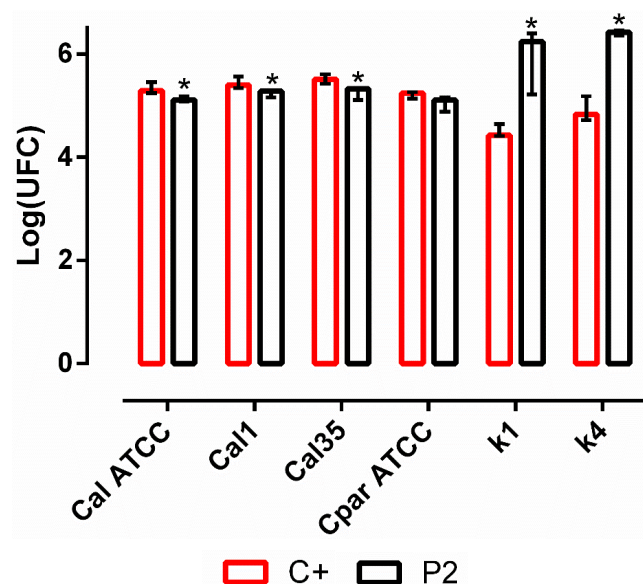


Figura 5.9. Estimación de las UFC totales adheridas al fondo del pocillo de una placa P6 (C+) o al fondo del pocillo recubierto con el sol-gel (P2). Datos representados como \log_{10} (Mediana) de los resultados obtenidos en tres replicados biológicos *: $P < 0.05$.

5. Resultados

5.2.2. Estudio de prevención de la formación de biopelículas sobre piezas de Titanio recubiertas con el sol-gel cargado con antifúngicos

Estudio de las levaduras no adheridas al recubrimiento La presencia del recubrimiento cargado con fluconazol causó una reducción significativa en la presencia de levaduras planctónicas no adheridas al recubrimiento independientemente de la concentración de antifúngico cargada (**Figura 5.10**). El efecto del recubrimiento cargado con anidulafungina se observó en las cepas de *C. albicans* con cualquier concentración de antifúngico cargada, mientras que en las cepas de *C. parapsilosis* fue más variable: en la cepa de referencia *C. parapsilosis* ATCC 22019 la reducción de levaduras planctónicas la produjo el recubrimiento A100 ($P=0.0022$); en la cepa clínica κ1 el efecto no fue significativo aunque se observó una tendencia de reducción dependiente de la concentración de antifúngico ($P=0.0795$ y $P=0.0649$ con A75 y A100 respectivamente); y en la cepa κ4 la reducción fue significativa con cualquier concentración de antifúngico (**Figura 5.11**).

Además, el efecto máximo de reducción siempre fue causado por la carga más alta de antifúngico (F100 o A100). El fluconazol afectó en mayor medida a la viabilidad de las levaduras planctónicas que la anidulafungina (**Tabla 5.4**), especialmente en las cepas de *C. parapsilosis*, en las que llegó a reducir un 70% más que ésta (cepa κ4).

	F100	A100
<i>C. albicans</i> ATCC	-84.13	-78.23
Cal 1	-99.99	-99.04
Cal 35	-89.6	-58.26
<i>C parapsilosis</i> ATCC	-99.99	-46.22
K1	-74.65	-11.97
K4	-88.76	-18.12

Tabla 5.4. Porcentaje de reducción máxima de la viabilidad de levaduras planctónicas en presencia de los recubrimientos cargados con la saturación máxima de fluconazol (F100) o anidulafungina (A100).

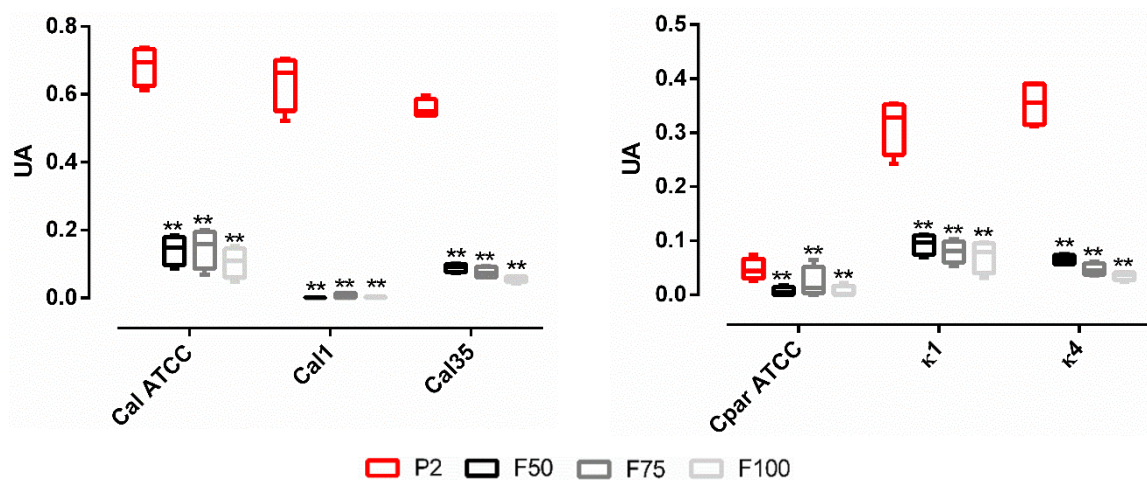


Figura 5.10. Cantidad de levaduras planctónicas presentes en el medio tras la incubación de piezas de titanio recubiertas con F50, F75, F100 o el control sin carga (P2). Datos representados como mediana y rango intercuartílico de las absorbancias (unidades de absorbancia, UA) obtenidas en al menos tres experimentos independientes. *: $0.05 > P > 0.01$; **: $P < 0.01$.

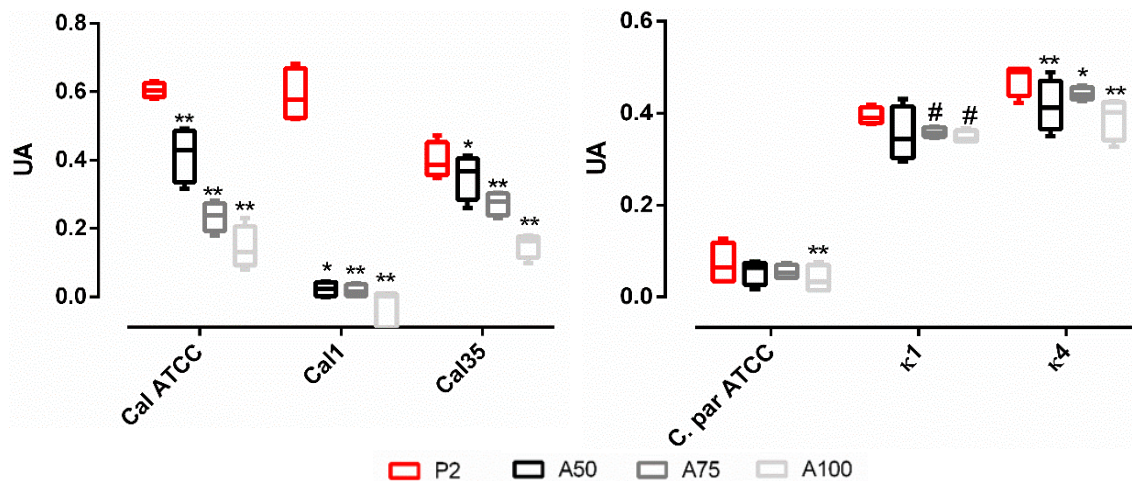


Figura 5.11. Cantidad de levaduras planctónicas presentes en el medio tras la incubación de piezas de titanio recubiertas con A50, A75, A100 o el control sin carga (P2). Datos representados como mediana y rango intercuartílico de las absorbancias (unidades de absorbancia, UA) obtenidas en al menos tres experimentos independientes. *: $0.05 > P > 0.01$; **: $P < 0.01$; #: $0.051 > P > 0.099$.

5. Resultados

Estudio de la inhibición de la formación de biopelículas por los recubrimientos:

De forma similar al efecto observado en las levaduras planctónicas, la presencia del recubrimiento cargado con la máxima concentración de fluconazol (F100) o anidulafungina (A100) fue la que causó la mayor reducción del desarrollo de biopelículas en ambas especies (**Figura 5.12**). En las cepas de *C. albicans*, A100 redujo entre un 10 y un 19% más la formación de biopelículas que el fluconazol, llegando a reducir un 99,12% el desarrollo de la biopelícula en la cepa clínica Cal35 (**Tabla 5.5**). Además, los recubrimientos cargados con fluconazol produjeron en estas cepas un efecto dependiente de la concentración, mientras que la anidulafungina produjo un efecto independiente (**Figura 5.13**).

Las piezas cargadas con F100 tuvieron más efecto en las cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 y κ4, y el recubrimiento A100 redujo más eficientemente la producción de biopelícula en la cepa κ1.

	F100	A100
<i>C. albicans</i> ATCC	-73.33	-83.06
Cal 1	-70.97	-98.42
Cal 35	-70.97	-99.12
<i>C. parapsilosis</i> ATCC	-88.28	-77.92
K1	-63.13	-93.54
K4	-76.07	-60.42

Tabla 5.5. Porcentaje de reducción máxima del desarrollo de biopelículas en presencia de los recubrimientos cargados con la saturación máxima de fluconazol (F100) o anidulafungina (A100).

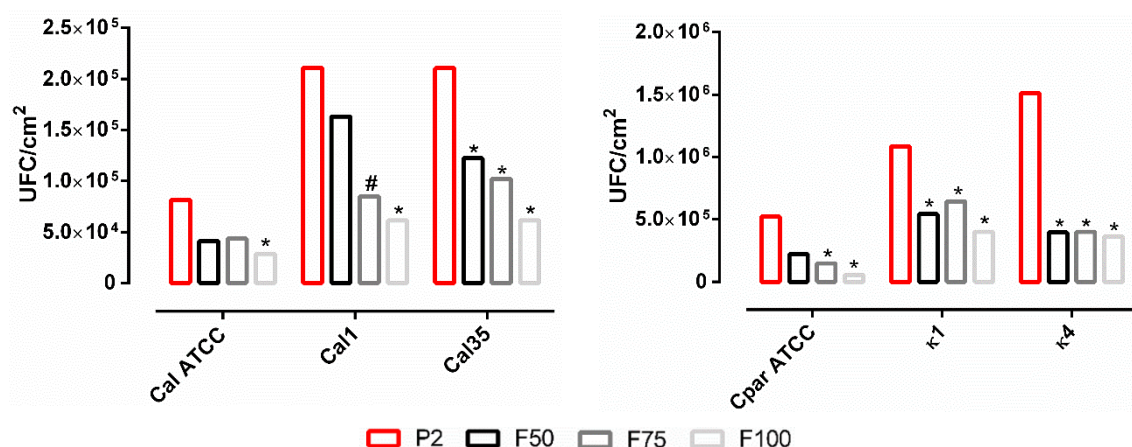


Figura 5.12. Cuantificación de las biopelículas producidas sobre piezas de titanio recubiertas con F50, F75, F100 o el control sin carga (P2). Datos representados como mediana y rango intercuartílico de las UFC/cm² cuantificadas mediante *drop plate* en al menos tres experimentos independientes. *: $0.05 > P > 0.01$; **: $P < 0.01$; #: $0.051 > P > 0.099$.

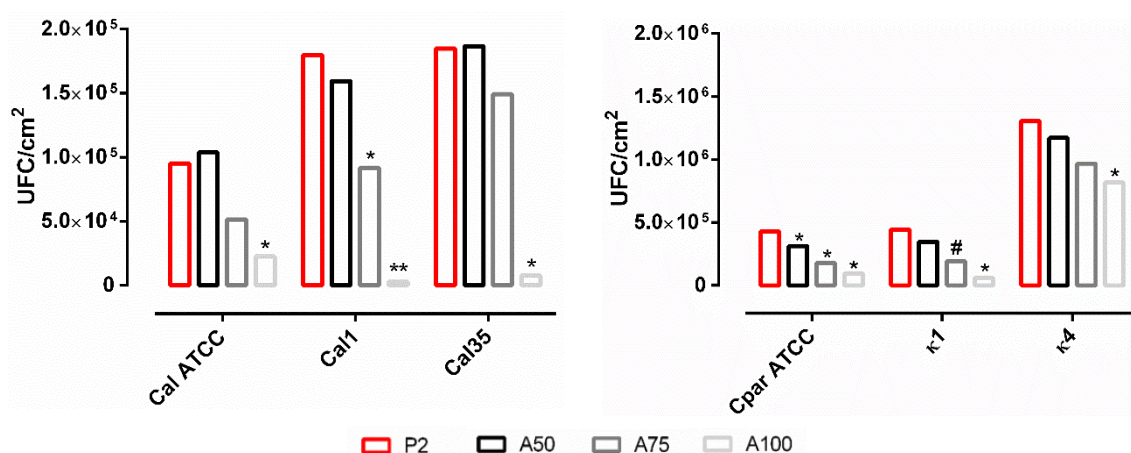


Figura 5.13. Cuantificación de las biopelículas producidas sobre piezas de titanio recubiertas con A50, A75, A100 o el control sin carga (P2). Datos representados como mediana y rango intercuartílico de las UFC/cm² cuantificadas mediante *drop plate* en al menos tres experimentos independientes. *: $0.05 > P > 0.01$; **: $P < 0.01$; #: $0.051 > P > 0.099$.

5.2.3. Evaluación del tratamiento de biopelículas con los recubrimientos cargados con antifúngicos

Los resultados de estos experimentos indicaron que en las cepas de *C. albicans* la presencia del recubrimiento fue la que produjo una bajada significativa de la viabilidad de las biopelículas ($P < 0.001$). La adición de fluconazol tuvo un efecto significativo solo con los recubrimientos F50, disminuyendo ligeramente la viabilidad respecto a P2, (Fig. 5.14A), y la adición de anidulafungina solo tuvo un efecto significativo en la cepa de referencia *C. albicans* ATCC 10231, provocando un mayor descenso en la viabilidad en comparación con P2. Este efecto no se observó en las cepas clínicas, aunque se puede apreciar una tendencia dependiente de la concentración (Fig. 5.15A y Tabla 5.6).

En las cepas de *C. parapsilosis*, de forma análoga a lo observado en los experimentos de adherencia, P2 aumentó ligeramente la formación de biopelículas y fue la

5. Resultados

presencia de antifúngico la que produjo la bajada de viabilidad, siendo mucho más efectivo el fluconazol (Fig. 5.14B) que la anidulafungina (Fig. 5.15B, Tabla 5.6).

	F100	A100
<i>C. albicans</i> ATCC	-15.18 (F50)	-24.51
Cal 1	-5.28 (F50)	-16.09
Cal 35	-8.26 (F50)	-7.16
<i>C parapsilosis</i> ATCC	-99.99	-20.94
K1	-65.21 (+6% F0)	+5% A100 (+17% A0)
K4	-99.99 (+8% F0)	-7.09

Tabla 5.6. Porcentaje de reducción máxima de biopelículas tratadas con los recubrimientos cargados, salvo indicado, con la saturación máxima de fluconazol (F100) o anidulafungina (A100).

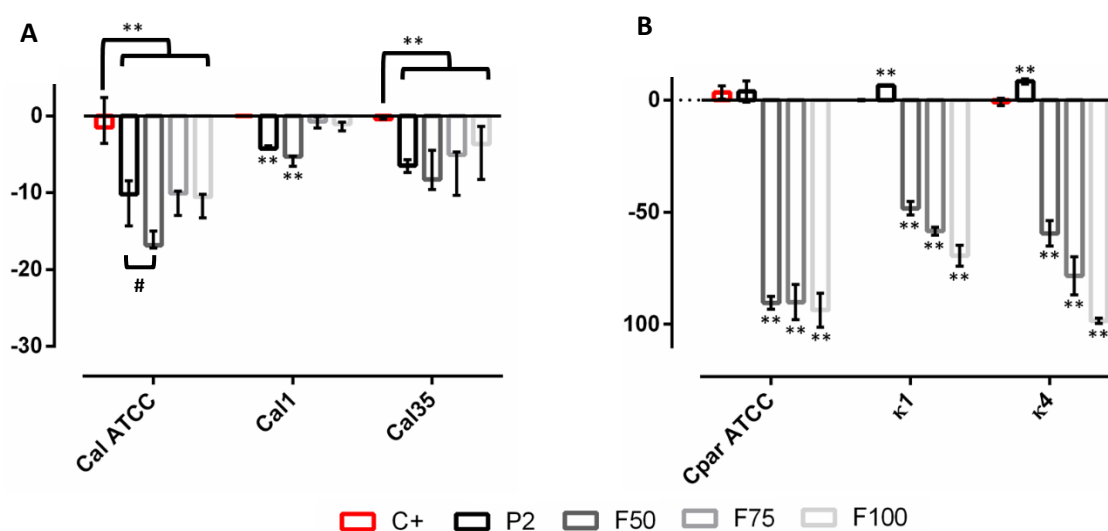


Figura 5.14. Evaluación del tratamiento de biopelículas producidas por las cepas de *C. albicans* (A) y *C. parapsilosis* (B) con F50, F75, F100 y P2 (control sin carga). Comparaciones realizadas respecto al control positivo (sin tratamiento) y a P2. Datos representados como mediana y rango intercuartílico del porcentaje de reducción de la viabilidad medido en al menos tres experimentos independientes. *: $0.05 > P > 0.01$; **: $P < 0.01$; #: $0.051 > P > 0.099$.

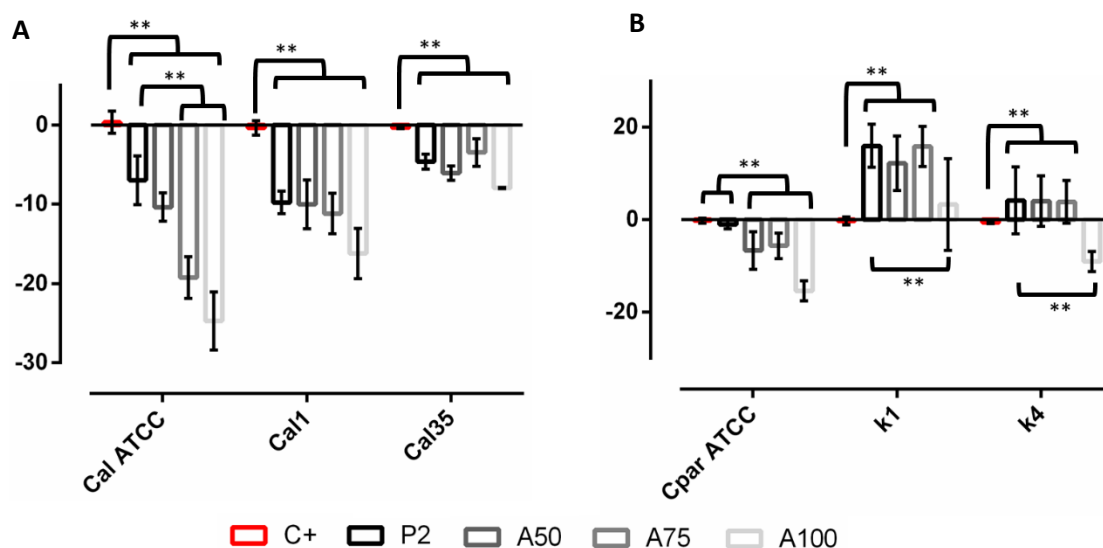


Figura 5.15. Evaluación del tratamiento de biopelículas producidas por las cepas de *C. albicans* (A) y *C. parapsilosis* (B) con A50, A75, A100 y P2 (control sin carga). Comparaciones realizadas respecto al control positivo (sin tratamiento) y a P2. Datos representados como mediana y rango intercuartílico del porcentaje de reducción de la viabilidad medido en al menos tres experimentos independientes. *: $0.05 > P > 0.01$; **: $P < 0.01$; #: $0.051 > P > 0.099$.

5.2.4. Evaluación de la citotoxicidad y proliferación en células de mamífero a la exposición del recubrimiento sol-gel

No se observó ningún efecto significativo de citotoxicidad ni proliferación como consecuencia de la presencia del recubrimiento o de los antifúngicos ($P > 0.05$ en todos los casos). **Figura 5.16).**

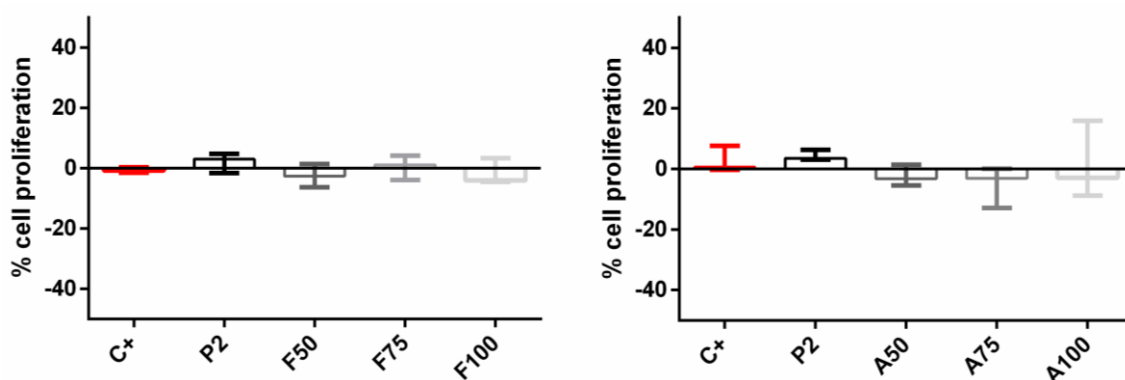


Figura 5.16. Porcentaje de proliferación celular en presencia de los recubrimientos cargados con fluconazol (F50, F75, F100) o anidulafungina (A50, A75, A100), control sin carga (P2) o sin presencia de recubrimiento (control positivo).

6. Discusión

6.1. Formación de biopelículas y patogenicidad

6.1.1. Análisis de la formación de biopelículas

Como se ha visto en la Introducción de esta tesis, *C. albicans* produce biopelículas complejas, compuestas por gran cantidad de blastosporas embebidas en matriz extracelular. Esta composición puede observarse en dos fases, una inferior de levaduras adheridas al sustrato y otra superior de elementos filamentosos y matriz extracelular (Chandra *et al.* 2001). Además, factores como la temperatura, concentración de CO₂ o composición del medio de crecimiento determinan la proporción final de hifas, pseudohifas y blastosporas que conformen el micelio (Cavalheiro and Teixeira 2018). Por su parte, las biopelículas de *C. parapsilosis* están compuestas por una menor cantidad de matriz extracelular, una mayor densidad de levaduras y los elementos filamentosos, cuando están presentes, son pseudohifas (Lattif *et al.* 2010). Por último, las biopelículas de *C. auris* se componen de densos agregados de levaduras con poca o nula matriz extracelular (Borman *et al.* 2017) y son similares a biopelículas producidas por otras especies como *C. glabrata* (Silva *et al.* 2012), *C. haemulonii* (Ben-Ami *et al.* 2017), o los primeros estadios de formación de biopelículas en especies como *C. parapsilosis* o *C. orthopsilosis* (Kean *et al.* 2018).

En general, la composición de las biopelículas observadas en los experimentos concuerda con lo publicado en la literatura. Las biopelículas alcanzaron su madurez entre las 48 y las 72 h, marcada por un incremento significativo de la viabilidad y la confluencia, que además coincidió con la formación de elementos filamentosos en cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis*, que no fueron observados en *C. auris* en ningún momento. Pasadas las 72 h, debido al agotamiento de los nutrientes del medio la viabilidad y la superficie cubierta en las biopelículas de *C. albicans* y *C. auris* comenzaron a disminuir hasta llegar en algunos casos a valores cercanos a los observados a las 24 horas.

Comparando todos los parámetros de formación de biopelículas analizados, las cepas clínicas produjeron significativamente más cantidad de biopelícula que las cepas de referencia, siendo las cepas de *C. albicans* las que mayor cantidad produjeron de las tres especies, seguidas de las cepas de *C. parapsilosis* y *C. auris*. Esta diferencia entre cepas clínicas y cepas de referencia se debe a que la mayoría de aislados clínicos tienen una mayor capacidad de producción de factores de virulencia y formación de biopelículas (Alnuaimi *et al.* 2013). Curiosamente, aunque las cepas clínicas de *C. auris* produjeron cantidades similares de biomasa viable que las cepas de *C. parapsilosis*, produjeron valores más altos de viabilidad y superficie cubierta, indicando una mayor densidad de blastoconidias en sus biopelículas.

Por otra parte, pudimos observar que la formación de elementos filamentosos no fue un rasgo común de las biopelículas maduras producidas por todas las cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis*. Solo dos de las cepas de clínicas de *C. albicans*, y la cepa de referencia y una cepa clínica de *C. parapsilosis* manifestaron la presencia de hifas y/o pseudohifas a partir de las 48h. De acuerdo con la literatura revisada hasta ese momento era previsible encontrar elementos filamentosos en las biopelículas maduras de estas dos especies, teniendo en cuenta que se utilizó medio RPMI suplementado con glucosa 2% y MOPS a pH 7.0 y 37°C, el cual se ha demostrado que modula positivamente la formación de biopelículas en ambas especies al disponer de una mayor fuente de aminoácidos que otros medios y al promover la expresión de genes de adhesinas (Kucharikova *et al.* 2011, Pereira *et al.* 2015, Weerasekera *et al.* 2016). Sin embargo, se ha demostrado que la presencia de glucosa produce una inhibición de la filamentación en cepas de *C. albicans* (Santana *et al.* 2013, Buu and Chen 2014). Además, el hecho de que la cepa de referencia *C. albicans* ATCC 10231 no tenga producción de hifas es debido a que proviene de un aislado no invasivo, que tiene una virulencia muy atenuada y una capacidad muy reducida de filamentación (Thewes *et al.* 2008) en comparación con otras cepas de referencia como la SC5314 (Hua *et al.* 2009). Por tanto, la capacidad invasiva de cada cepa de *C. albicans* podría explicar el por qué ciertas cepas clínicas no han desarrollado elementos filamentosos y otras sí incluso en un medio que inhibe parcialmente este proceso. Otros parámetros

adicionales que favorecerían la filamentación en *C. albicans* son la limitación de nutrientes y una baja densidad de células (menor a 10^6 UFC/ml) (Nadeem *et al.* 2010). En el caso de las cepas de *C. parapsilosis*, se ha demostrado que éstas son altamente heterogéneas y capacidad de filamentación está más asociada al perfil genético de cada una (Enger *et al.* 2001, Silva *et al.* 2009).

Investigaciones recientes han descubierto que en *C. auris* no existen los genes *candidalysin* (ECE1) y *hyphal cell wall protein* (HWP1), ambos esenciales en el proceso de filamentación y altamente expresados por *C. albicans* (Munoz *et al.* 2018), lo que explicaría la no observación de elementos filamentosos en esta especie. Sin embargo, Sherry *et al* (Sherry *et al.* 2017), demostraron la presencia muy poco frecuente de estructuras que recuerdan a pseudohifas en biopelículas tempranas de *C. auris*, proponiendo que son una forma muy rudimentaria de filamentación en esta especie; y el equipo de Wang *et al* demostró que la formación de estas estructuras se induce con el estrés osmótico y se forman por una división incompleta de las levaduras (Wang *et al.* 2018). Por último, H. Yue *et al.* demostraron que la infección de un mamífero induce cambios fenotípicos que llevan a la formación de filamentos en el patógeno (Yue *et al.* 2018). Esto puede suponer el descubrimiento de una nueva vía de filamentación en esta especie, lo que indica que hacen falta nuevos estudios enfocados a su caracterización.

Analizando el espesor obtenido en las medidas de microscopía confocal, se encontró que en general las biopelículas fueron significativamente menores en espesor al comparar con otros trabajos realizados con *C. albicans* y *C. parapsilosis* (Chandra *et al.* 2001, Santana *et al.* 2013). Sin embargo, en estos trabajos los experimentos se realizaron con medio YNB (Yeast Nitrogen Base), en contraste con el medio RPMI usado en los de esta tesis, que se ha demostrado que contribuye a producir biopelículas más delgadas (Kucharikova *et al.* 2011). Además, la formación de biopelículas sobre las placas de Ibdi se realizó con una agitación suave de 60-80 rpm, lo que condiciona la formación de biopelículas significativamente menos gruesas pero más densas, sin afectar a la actividad metabólica de las levaduras (Mukherjee *et al.* 2009).

En este punto hay que añadir que este estudio presenta varias limitaciones, por ejemplo, la toma al azar de imágenes provoca la captura de campos de muy alta densidad de levaduras, y por tanto de fluorescencia, en contraste con campos muy poco poblados que registraron valores bajos, lo que puede afectar al análisis estadístico de los datos. Además, en algunos casos las imágenes no se tomaron en el nivel de máxima señal de fluorescencia, lo que repercute en la toma de una imagen que no muestra la superficie cubierta real de ese campo, si no cortes transversales más elevados. Por otra parte, la macro utilizada realiza en cada imagen una segmentación por *thresholding* automática sobre la cual hace el conteo de partículas con fluorescencia roja o verde. Esta segmentación automática en campos de fluorescencia saturante da lugar a valores erróneos, que en todos los casos fueron corregidos repitiendo el análisis de forma manual en esas imágenes específicas. Finalmente, el número de imágenes tomadas es bajo en comparación con otros estudios que toman hasta 40 imágenes por campo, y el análisis de la fluorescencia roja emitida por FUN-1 solo permite observar diferencias cualitativas en la viabilidad, no cuantitativas. Estas limitaciones también pueden aplicarse al estudio de tratamiento de las biopelículas de *C. auris* con antifúngicos.

6.1.2. Modelo *in vivo* de infección de *C. auris* en *G. mellonella*

En estos experimentos se caracterizó el efecto de la infección de larvas de *G. mellonella* con cepas de *C. auris* y los resultados se compararon con los obtenidos usando cepas de *C. albicans*. Teniendo en cuenta los otros trabajos que se han realizado con *C. auris* en *G. mellonella* (Borman *et al.* 2017, Sherry *et al.* 2017) en los experimentos realizados en esta tesis se analizan otros parámetros además de la supervivencia de las larvas, como son el grado de actividad, formación de pupa y la melanización de la cutícula del insecto, que proporcionan información complementaria útil a la hora de evaluar los resultados. El modelo de *G. mellonella* ha demostrado ser altamente eficaz para realizar el cribado de cepas bacterianas y fúngicas o para la evaluación de tratamientos (Tsai *et al.* 2016), por tanto, una mejor caracterización del modelo permitirá obtener unos resultados más precisos. A modo de ejemplo práctico, con los resultados obtenidos se puede afirmar que la cepa clínica Cal35 es la más

6. Discusión

virulenta de todas, ya que causó la muerte de más del 80% de las larvas. Sin embargo, a la hora de escalar los experimentos a un modelo animal en mamífero como el ratón para un mejor estudio de la patogenicidad, el análisis de la actividad, la melanización y la formación de pupa indican que la cepa clínica Cal2 sería un mejor candidato para su evaluación, ya que causó la muerte de en torno el 50% de las larvas pero de una forma más progresiva, redujo la actividad en un 40% e indujo una fuerte melanización en un 60% en las primeras 24 h tras la inoculación. Por tanto, Cal2 provocaría más probablemente la aparición de la enfermedad en ratón sin causar la muerte acelerada de los individuos.

En los resultados analizados las cepas clínicas fueron más patogénicas que las cepas de referencia independientemente de la especie evaluada, provocando una mayor mortalidad acompañada de un mayor incremento de la melanización y una bajada de la actividad y la formación de pupa respecto a los controles, que en este modelo es un signo del desarrollo de una enfermedad (Tsai *et al.* 2016). Estas diferencias en los aislados clínicos han sido descritas en otros trabajos en los que se compara la producción de factores de virulencia en especies del género *Cándida*, y han sido asociadas a una mayor plasticidad genómica de las cepas clínicas (Monroy-Perez *et al.* 2016).

Asimismo, las cepas de *C. albicans* fueron más patogénicas que las de *C. auris*, produciendo una mayor mortalidad y un mayor descenso de la actividad. Esta diferencia también ha sido indicada en los trabajos que compararon la virulencia de estas dos especies en *G. mellonella* (Borman *et al.* 2017, Sherry *et al.* 2017). Por lo observado en estos primeros trabajos *in vivo*, se propuso que el principal motivo de estas diferencias era que *C. auris* expresaba menos factores de virulencia que *C. albicans*. Desde entontes, aunque se han descrito cepas aisladas que expresaban niveles de fosfolipasas, proteasas y enzimas líticas comparables a *C. albicans* (Kumar *et al.* 2015, Larkin *et al.* 2017), *C. auris* no presenta filamentación, que es un importante factor de patogenicidad en *C. albicans* (Fuchs *et al.* 2010).

Por otra parte, analizando los resultados del modelo de infección de *C. auris* no se observaron diferencias significativas en la mortalidad producida por la cepa agregativa Cau63 y las no agregativas *C. auris* DSM 21092 y Cau40, en contraste con los trabajos de Sherry *et al.* y Borman *et al.* mencionados anteriormente, que informan de una mayor virulencia en las cepas no agregativas. Sin embargo, nuestros resultados indicaron que las cepas no agregativas sí produjeron un mayor descenso en la actividad de las larvas que la cepa agregativa, mientras que ésta produjo los valores de melanización más altos de entre todas las cepas evaluadas en el trabajo (80%). Aunque el número de cepas evaluadas en este estudio es pequeño, este resultado sugiere que el fenotipo de las cepas de *C. auris* desencadena una respuesta inmune diferencial en el modelo. Una posible hipótesis para explicar estas diferencias podría basarse en que los agregados de la cepa Cau63 fuesen más fácilmente reconocibles por los elementos de la respuesta inmune presentes en la hemolinfa de las larvas, entre ellos el zimógeno de la fenoloxidasa, que se activa en contacto con los residuos β -1,3-glucano de la pared celular del hongo (Sheehan and Kavanagh 2018) y desencadena la producción de melanina para encapsular a los agregados y hacerlos más accesibles a los fagocitos (Lu *et al.* 2014). Esto último provocaría la mayor melanización observada en la infección con la cepa agregativa. Esta hipótesis sería consistente con lo señalado por Borman *et al.*, que observaron que en larvas infectadas con cepas no agregativas las levaduras invadían las células fagocíticas, mientras que en larvas infectadas con cepas agregativas se observaron grandes agregados de levaduras en la hemolinfa y no se observó la invasión de los fagocitos (Borman *et al.* 2017).

6.1.3. Estudios de susceptibilidad a antifúngicos

A pesar del bajo número de cepas estudiadas, los resultados de las CMIs obtenidas en este apartado son consistentes con los obtenidos por otros grupos que evaluaron la susceptibilidad a antifúngicos de un número mucho mayor de cepas de *C. auris* mediante el método de microdilución del EUCAST (Arendrup *et al.* 2017) o del CLSI (Chowdhary *et al.* 2018), y que describieron que entre el 90% y el 97% de los aislados de *C. auris* fueron resistentes a fluconazol ($\text{MIC} \geq 2 \text{ mg/L}$). Además, el porcentaje de cepas descritas como multirresistentes fue del 25%, y las descritas como resistentes a

6. Discusión

varios azoles del 13%, respaldando la hipótesis de que *C. auris* tiene una resistencia intrínseca a ellos. De hecho, debido a los estudios que comunicaban cepas resistentes a fluconazol y anfotericina B en los primeros trabajos sobre el patógeno, el tratamiento empírico recomendado en infecciones sistémicas causadas por *C. auris* son las equinocandinas (Cornely *et al.* 2014, Tragiannidis *et al.* 2015, Pappas *et al.* 2016); sin embargo, la identificación de cepas resistentes a estos compuestos va en aumento y se espera que esta tendencia continúe (Vallabhaneni *et al.* 2016). De hecho, algunos autores incluso han llegado a proponer que es factible una pan-resistencia en este patógeno (Lockhart *et al.* 2017).

Otros trabajos que han realizado análisis genéticos para evaluar la resistencia a antifúngicos en este patógeno han identificado numerosos genes ortólogos a genes responsables de la adquisición de resistencia a antifúngicos en *C. albicans* y *C. parapsilosis*, como kinasas, bombas de expulsión, MFSs (*Major Facilitator Superfamilies*) y mutaciones en genes relacionados con la adquisición de resistencia a triazoles (Chatterjee *et al.* 2015, Sharma *et al.* 2016). Análisis más específicos han hallado que aproximadamente el 40% de las proteínas de *C. auris* tienen sus ortólogos en *C. lusitaniae* (Sharma *et al.* 2016) y *C. haemulonii* (Espinell-Ingroff *et al.* 2017), dos especies con reducida sensibilidad a azoles y anfotericina B, por tanto, es posible que estas especies compartan mecanismos comunes de adquisición de resistencia.

En comparación con los resultados de CMIs, las CMEBs obtenidas fueron todas mucho más elevadas en general, llegando en algunos casos a multiplicar por 8000 su valor. La anfotericina B mantuvo actividad frente a las biopelículas de *C. albicans* y *C. parapsilosis*, pero no frente a las de *C. auris*. Esta diferencia en la susceptibilidad entre células planctónicas y biopelículas ha sido descrita en numerosos trabajos en los que se comparan estos dos parámetros de susceptibilidad en especies del género *Cándida* (Chandra *et al.* 2001, Kuhn and Ghannoum 2004, Rodrigues *et al.* 2018). Además, está demostrado que al igual que ocurre en biopelículas bacterianas, la formación de biopelículas en hongos lleva consigo un incremento sustancial de la resistencia a compuestos antimicrobianos (Chandra *et al.* 2001), debido principalmente al aumento de matriz extracelular, que impide la penetración efectiva de los mismos en la

estructura de la biopelícula (Nett *et al.* 2010), la alteración de ciertos genes o el aumento de la densidad de blastosporas (Perumal *et al.* 2007, Silva *et al.* 2012).

En nuestro estudio, las biopelículas producidas por las cepas de *C. auris* no manifestaron sensibilidad frente a ninguno de los antifúngicos utilizados, alcanzando en todos los casos CMEBs superiores a 32 mg/L salvo en el caso de la cepa *C. auris* DSM 21092, que sí fue susceptible a anidulafungina (8 mg/L). Estos valores concuerdan con los publicados en trabajos que han examinado la susceptibilidad de las biopelículas de *C. auris* (Sherry *et al.* 2017).

Esta diferencia en sensibilidad respecto a otras especies del género *Cándida* está comenzando a ser investigada. Por ejemplo, recientemente se ha descubierto que los polisacáridos de la matriz extracelular de las biopelículas de *C. auris* secuestran hasta el 70% de los azoles del medio, con lo que juegan un papel mucho más importante en la adquisición de la resistencia a estos compuestos que en otras especies (Dominguez *et al.* 2019). Esto contrasta con el hecho de que *C. auris* produce una matriz extracelular muy poco abundante, con lo que deben existir mecanismos adicionales para explicar la tolerancia a los antimicrobianos, como la existencia de un metabolismo acelerado o la sobreexpresión de genes de resistencia.

6.1.4. Tratamiento de biopelículas de *C. auris* con antifúngicos mediante microscopía confocal

El análisis del tratamiento de las biopelículas producidas por *C. auris* con antifúngicos usados comúnmente es algo novedoso y sobre lo que no hay publicaciones al respecto, Diversas publicaciones previas habían evaluado el tratamiento de biopelículas producidas por otras especies del género *Cándida* usando microscopía confocal (Chandra *et al.* 2001, Kuhn *et al.* 2002, Bernhardt *et al.* 2003), indicando que los diversos tratamientos provocaban cambios en sus estructuras, afectando a su espesor y a su viabilidad. En este trabajo hemos realizado, a modo de prueba de concepto, una evaluación de los efectos del tratamiento en la estructura de las biopelículas producidas por cepas de *C. auris* con anfotericina B, fluconazol y anidulafungina durante 24 h. Los resultados indicaron que los distintos tratamientos fueron efectivos para tratar las biopelículas de 24 y 48 h, produciendo un descenso significativo la

6. Discusión

viabilidad y la superficie cubierta especialmente durante su etapa de maduración, entre las 24 y las 48h, afectando de forma variable a los espesores.

En la cepa de referencia *C. auris* DSM 21092 los distintos tratamientos produjeron una disminución significativa de la viabilidad y la superficie cubierta, siendo la anidulafungina el antifúngico que tuvo un efecto más notable especialmente en las biopelículas de 48 h. Este efecto se debe al mecanismo de acción del fármaco, que inhibe la síntesis de glucanos de la pared celular, esenciales en la producción de matriz extracelular y proliferación durante la etapa de maduración de las biopelículas.

El tratamiento con anidulafungina y fluconazol de la cepa clínica Cau40 produjo un efecto paradójico en los espesores, que fueron ligeramente superiores en comparación con el control sin tratamiento. Este efecto ha sido descrito en biopelículas tratadas con equinocandinas en varias especies de *Candida*, y se dan como consecuencia de cambios en la concentración de quitina en la pared celular debido a la respuesta adaptativa; que da lugar a la aparición de células más grandes y de aspecto globoso debido a los efectos del antifúngico (Melo *et al.* 2007, Kaneko *et al.* 2013). Sin embargo, teniendo en cuenta que no se observaron esos cambios de morfología en el análisis de imágenes y que este efecto no se ha descrito en tratamientos con fluconazol, el ligero aumento de los espesores podría atribuirse a un efecto de la presión selectiva impuesta por los antifúngicos o bien a potenciales errores en la medición de los espesores.

En el caso de la cepa clínica cau63, solo el tratamiento con anfotericina B a las 24 y 48 h disminuyó significativamente el espesor de las biopelículas, y produjo una bajada de la viabilidad y la superficie cubierta en las biopelículas de 48 h, al igual que el fluconazol. La anidulafungina no tuvo ningún efecto sobre los espesores, mientras que redujo significativamente la viabilidad y la superficie cubierta en las biopelículas crecidas durante 24 h.

Curiosamente, los tratamientos fueron más efectivos en las cepas no agregativas que en la cepa agregativa. Estos resultados podrían explicarse debido a que la disposición en agregados desde fases previas a la formación de las biopelículas aportaría una mayor densidad celular que dificultaría el contacto del antifúngico con todas las levaduras. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido comprobada en el presente trabajo,

por lo que serían necesarios más estudios para evaluar la formación de biopelículas por cepas agregativas de *C. auris* desde fases muy tempranas (0-6 h).

Actualmente no hay grupos que hayan descrito explícitamente una infección por *C. auris* asociada al desarrollo de una biopelícula, sin embargo, sí se han comunicado casos en los que la retirada de un catéter venoso central o urinario ha sido fundamental para la remisión de infecciones sistémicas causadas por éste patógeno (Lee *et al.* 2011, Chowdhary *et al.* 2014, Ruiz Gaitan *et al.* 2017). Además, la presencia de elementos médicos implantables como catéter venoso central, catéter urinario o tubos de nutrición parenteral ha sido considerada un factor de riesgo para la infección por especies del género *Cándida* (Kojic and Darouiche 2004). Por otra parte, Larkin *et al.* realizaron experimentos de adherencia de *C. auris* sobre material de catéter y descubrieron que el patógeno tiene una capacidad muy reducida de adherirse a estos materiales en comparación con *C. albicans*, concluyendo que la adherencia a estos dispositivos no era una de las causas principales para desarrollar una infección invasiva y su contribución es relativamente baja (Larkin *et al.* 2017).

Actualmente, y de acuerdo con las guías publicadas de monitorización de pacientes en los que se ha detectado una infección por *C. auris* (o especies no *albicans*) relacionada con la presencia de un catéter, la primera línea de tratamiento es la retirada del mismo y la administración por vía intravenosa de una primera dosis de carga de antifúngico, seguido de un régimen de administración diario variable (Lee *et al.* 2011, Chowdhary *et al.* 2014, Ruiz Gaitan *et al.* 2017). Los resultados obtenidos en esta tesis, por tanto, avalarían una terapia con anidulafungina al ser el antifúngico que causaría la mayor reducción en la viabilidad de los restos de biopelículas que pudieran quedar tras la retirada del catéter. La anidulafungina también sería efectiva en la primera dosis previa a la colocación de un sellado en pacientes en los que no fuese posible la retirada del catéter (Bouza *et al.* 2014).

6.2. Evaluación de los recubrimientos

Los recubrimientos sol-gel (P2) están compuestos de una mezcla de organopolisiloxanos (MAPTMS y TMOS), que forman un entramado de puentes siloxano y se adhieren al sustrato metálico mediante la formación de enlaces covalentes entre los grupos hidroxilo libres presentes en el sol-gel y el metal. Los recubrimientos están funcionalizados con tris(trimetilsilil) fosfito, cuya integración se da a través de una reacción de Michaelis-Arbuzov mediante la cual el organofosfito (fósforo trivalente) se transforma en organofosfato (fósforo pentavalente). Estudios de caracterización *in vitro* del sol-gel revelaron que la presencia del organofosfito aumenta de forma significativa la proliferación de osteoblastos de ratón (células MC3T3-E1) e induce la mineralización de la matriz, sin efectos significativos de citotoxicidad. Además, se demostró que los recubrimientos eran hidrófobos (ángulo de contacto = 87.5°), biodegradables en solución acuosa, al darse una reacción de hidrólisis que los descomponía en sus precursores en las primeras 24 h. (García-Casas *et al.* 2019).

Varios trabajos han demostrado que la presencia de compuestos orgánicos de fósforo en recubrimientos aplicados sobre implantes basados en Titanio favorece la osteointegración y la formación de hueso en el tejido peri-implante en las primeras etapas postquirúrgicas (Zeifang *et al.* 2008, Cardoso *et al.* 2017). Por otra parte, la hidrofobicidad de una superficie afecta negativamente a la adherencia de bacterias (Kinnari *et al.* 2010, Sukhorukova *et al.* 2015). Estos resultados pusieron de manifiesto que P2 era un buen candidato para favorecer la osteointegración de implantes en las primeras horas tras la cirugía y prevenir a la vez la infección por bacterias, que representa el 98% de estas infecciones. Gracias a estos resultados se continuó trabajando en los recubrimientos con el fin de incorporar compuestos antimicrobianos para prevenir y/o tratar infecciones de prótesis de forma efectiva, ya que la degradación del sol-gel permitiría su liberación al medio local.

El objetivo principal de esta tesis es la evaluación microbiológica de estos recubrimientos cargados con fluconazol o anidulafungina, con el fin de prevenir y/o tratar infecciones de prótesis producidas por hongos del género *Candida*.

Los experimentos de adherencia realizados con los recubrimientos sin carga indicaron que éstos redujeron hasta en un 34% la adherencia de levaduras de *C. albicans*, sin embargo, las levaduras de las cepas clínicas de *C. parapsilosis* se adhirieron hasta 65 veces más. En principio, la hidrofobicidad de P2 favorecería la adherencia de las levaduras mediante fuerzas de London-Van der Waals, llamadas comúnmente interacciones hidrófobas (Klotz *et al.* 1985), por lo que la menor adherencia de *C. albicans* podría deberse a la química de la degradación del recubrimiento. Durante la degradación hidrolítica del sol-gel los grupos SiO_2 pasan a encontrarse en forma de ácido ortosilícico (Si(OH)_4), que disminuiría la adherencia de *C. albicans* de acuerdo a un estudio de 2014 en el que se observaba este efecto en films compuestos de complejos silano- SiO_2 (Yodmongkol *et al.* 2014). Sin embargo, en este trabajo no se evaluó la degradación química de estos films.

Otro factor que contribuiría a explicar las diferencias entre ambas especies es la mayor hidrofobicidad de superficie de *C. parapsilosis*, lo que aumenta su capacidad de adhesión a superficies abióticas (Panagoda *et al.* 2001, Silva-Dias *et al.* 2015). Además, recientemente se ha descubierto que las cepas de *C. parapsilosis* presentan una alta variabilidad genómica, y en concreto se han aislado cepas con numerosas repeticiones de genes análogos a los Als de *C. albicans*, que codifican adhesinas que intervienen en la adherencia a superficie bióticas y abióticas (Pryszcz *et al.* 2013). *C. albicans*, en cambio, mantiene una estabilidad en el número de copias de estos genes (Hoyer *et al.* 2008).

En los experimentos de prevención de la formación de biopelículas realizados con los recubrimientos cargados con antifúngicos se observó un efecto dependiente de la concentración, A100 fue más efectivo en las cepas de *C. albicans* y F100 lo fue en las de *C. parapsilosis*. Esta diferencia se debe a que las cepas de *C. parapsilosis* tienen mayor tolerancia a las equinocandinas (Garcia-Effron *et al.* 2008), algo que también se observó en los resultados de susceptibilidad de estas cepas (Romera *et al.* 2019).

Sin embargo, en la evaluación de las levaduras no adheridas, F100 fue el más efectivo en las dos especies, reduciendo su presencia en más del 75% en todos los casos. Este efecto también podría deberse a una menor liberación de la anidulafungina del entramado molecular del sol-gel durante su degradación, debido al mayor tamaño de

6. Discusión

sus moléculas. Por tanto, serían necesarios más experimentos para evaluar la liberación de los antifúngicos.

En los estudios del tratamiento de biopelículas los resultados mostraron la misma dinámica que en los ensayos de prevención: los recubrimientos cargados con anidulafungina fueron más efectivos en cepas de *C. albicans* y los cargados con fluconazol en las cepas de *C. parapsilosis*. Sin embargo, en las cepas de *C. albicans* la caída en la viabilidad se debió principalmente a la presencia de P2, mientras que la adición del antifúngico contribuyó ligeramente a este efecto, que no fue significativo en las cepas clínicas. Por el contrario, en las cepas de *C. parapsilosis* la presencia del recubrimiento produjo un ligero, aunque significativo aumento de la cantidad de biopelícula, y la presencia de fluconazol redujo drásticamente la viabilidad. Este efecto de la presencia del recubrimiento en principio solo debería observarse si éste se añadiese como tratamiento en la etapa de adherencia de las levaduras, por tanto, alguno de los componentes del sol-gel es posible que interaccione con las biopelículas maduras. De hecho, en los experimentos de prevención de la formación de biopelículas también se puede observar indirectamente la mayor adherencia al recubrimiento por parte de las cepas clínicas de *C. parapsilosis*: en la estimación de las levaduras no adheridas, las medidas de absorbancia de las cepas de *C. albicans* fueron más altas que las de *C. parapsilosis* (0.6 frente a 0.5), mientras que la estimación de las UFC/cm² de las cepas de *C. parapsilosis* fue de 5 a 7.5 veces mayor que la de las cepas de *C. albicans*.

Otro compuesto que se libera en la degradación del sol-gel es el fósforo derivado del organofosfito, que se encuentra en disolución formando fosfatos. El fósforo es un elemento esencial para la viabilidad de las levaduras al intervenir en la síntesis y replicación del ADN, y de hecho se han caracterizado sensores específicos para este elemento (Ikeh *et al.* 2017). El aumento de la concentración de fosfato en solución podría contribuir al mayor crecimiento observado de las biopelículas de *C. parapsilosis*, sin embargo, no existe literatura al respecto dado que los mayores esfuerzos se han centrado en *C. albicans*.

Asimismo, independientemente de la especie se observaron valores más altos en todas las medidas en las cepas clínicas en comparación con las cepas de referencia, lo que se relaciona directamente con la mayor capacidad de estas cepas de formar biopelículas. Además, se ha descubierto que las cepas bacterianas aisladas de infecciones de prótesis pueden tener aún más exacerbadas los factores de virulencia que los aislados clínicos de otras zonas (Rohde *et al.* 2007, Kim *et al.* 2015). Esto se debe a eventos de hipermutación aleatoria espontánea que ocurren en presencia de condiciones hostiles para el microorganismo como el suministro prolongado de antifúngicos durante el tratamiento, que generan una alta presión selectiva y generan policlonalidad en la población (De-la-Fuente *et al.* 2015). Este efecto podría darse también en hongos, aunque no ha sido caracterizado.

7. Conclusiones

1. Todas las cepas estudiadas tienen la capacidad de formar una biopelícula madura a partir de las 24 horas. El perfil genético de cada cepa, las condiciones de crecimiento y la cantidad de nutrientes del medio afectan en gran medida a su desarrollo. Las cepas clínicas tienen una mayor capacidad de crecimiento y formación de biopelícula que las cepas de referencia.
2. *C. albicans* forma las biopelículas con mayor cantidad de biomasa viable y matriz extracelular, mientras que las producidas por *C. parapsilosis* y *C. auris* se componen de una mayor cantidad de blastosporas y una menor cantidad de matriz extracelular. Los elementos filamentosos presentes en las biopelículas de *C. albicans* son hifas y pseudohifas, los de *C. parapsilosis* pseudohifas y *C. auris* no forma estas estructuras.
3. La correcta evaluación del modelo de infección en *G. mellonella* permite realizar un *screening* más preciso de las cepas. Las cepas clínicas fueron más patógenas que las cepas de referencia. *C. albicans* es más patogénica que *C. auris* en este modelo. Las cepas agregativas de *C. auris* son menos virulentas que las no agregativas, e inducen una mayor melanización y formación de pupa en las larvas.
4. Las biopelículas son mucho más resistentes al tratamiento con antifúngicos que las levaduras en estado planctónico, aumentando hasta en 8000 veces el valor de la CMI. Las biopelículas producidas por cepas de *C. auris* son resistentes a todos los antifúngicos estudiados, en cambio las producidas por *C. albicans* y *C. parapsilosis* mantienen la susceptibilidad a anfotericina B.

5. El tratamiento de 24 horas de biopelículas producidas por *C. auris* durante 48 y 72 horas reduce significativamente su viabilidad y su superficie cubierta, siendo la anidulafungina el antifúngico más efectivo.
6. El sol-gel biofuncionalizado con organofosfito sin adición de antifúngicos (P2) reduce la adherencia de levaduras de *C. albicans* hasta en un 34% y aumenta hasta en 65 veces la de las cepas clínicas de *C. parapsilosis*.
7. Los recubrimientos cargados con fluconazol reducen en mayor medida la presencia de levaduras planctónicas en el medio en las dos especies. Sin embargo, más estudios son necesarios para evaluar la liberación de los antifúngicos desde el sol-gel.
8. Los recubrimientos cargados con anidulafungina previenen más eficazmente la formación de biopelículas de *C. albicans* y los cargados con fluconazol la de *C. parapsilosis*.
9. El tratamiento con el recubrimiento sin antifúngicos (P2) es suficiente para reducir las biopelículas formadas por *C. albicans*, y la carga con antifúngicos aumenta ligeramente a este efecto.
10. El tratamiento con P2 estimula la formación de biopelículas de *C. parapsilosis*, y la carga con fluconazol reduce drásticamente su viabilidad.
11. Los recubrimientos cargados con las distintas concentraciones de antifúngicos no son citotóxicos ni afectan a la proliferación celular de osteoblastos de ratón.

8. Bibliografía

- Al-Fattani, M. A. and L. J. Douglas (2006). "Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance." *J Med Microbiol* **55**(Pt 8): 999-1008.
- Alem, M. A., M. D. Oteef, T. H. Flowers and L. J. Douglas (2006). "Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development." *Eukaryot Cell* **5**(10): 1770-1779.
- Almirante, B., D. Rodriguez, M. Cuenca-Estrella, M. Almela, F. Sanchez, J. Ayats, C. Alonso-Tarres, J. L. Rodriguez-Tudela and A. Pahissa (2006). "Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003." *J Clin Microbiol* **44**(5): 1681-1685.
- Alnuaimi, A. D., N. M. O'Brien-Simpson, E. C. Reynolds and M. J. McCullough (2013). "Clinical isolates and laboratory reference *Candida* species and strains have varying abilities to form biofilms." *FEMS Yeast Res* **13**(7): 689-699.
- Ameen, M. (2010). "Epidemiology of superficial fungal infections." *Clin Dermatol* **28**(2): 197-201.
- Anagnostakos, K., J. Kelm, E. Schmitt and J. Jung (2012). "Fungal periprosthetic hip and knee joint infections clinical experience with a 2-stage treatment protocol." *J Arthroplasty* **27**(2): 293-298.
- Anderson, J. M., T. L. Bonfield and N. P. Ziats (1990). "Protein adsorption and cellular adhesion and activation on biomedical polymers." *Int J Artif Organs* **13**(6): 375-382.
- Anderson, J. M., A. Rodriguez and D. T. Chang (2008). "Foreign body reaction to biomaterials." *Semin Immunol* **20**(2): 86-100.
- Araujo, D., M. Henriques and S. Silva (2017). "Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes." *Trends Microbiol* **25**(1): 62-75.
- Arciola, C. R., D. Campoccia and L. Montanaro (2018). "Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion." *Nat Rev Microbiol* **16**(7): 397-409.
- Arendrup, M. C., A. Prakash, J. Meletiadiis, C. Sharma and A. Chowdhary (2017). "Comparison of EUCAST and CLSI Reference Microdilution MICs of Eight Antifungal Compounds for *Candida auris* and Associated Tentative Epidemiological Cutoff Values." *Antimicrob Agents Chemother* **61**(6).
- Azzam, K., J. Parvizi, D. Jungkind, A. Hanssen, T. Fehring, B. Springer, K. Bozic, C. Della Valle, L. Pulido and R. Barrack (2009). "Microbiological, clinical, and surgical features of fungal prosthetic joint infections: a multi-institutional experience." *J Bone Joint Surg Am* **91 Suppl 6**: 142-149.
- Bassetti, M., E. Righi, A. Costa, R. Fasce, M. P. Molinari, R. Rosso, F. B. Pallavicini and C. Viscoli (2006). "Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care." *BMC Infect Dis* **6**: 21.
- Bekersky, I., R. M. Fielding, D. E. Dressler, J. W. Lee, D. N. Buell and T. J. Walsh (2002). "Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate in humans." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(3): 828-833.
- Ben-Ami, R., J. Berman, A. Novikov, E. Bash, Y. Shachor-Meyouhas, S. Zakin, Y. Maor, J. Tarabia, V. Schechner, A. Adler and T. Finn (2017). "Multidrug-Resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, Tel Aviv, Israel." *Emerg Infect Dis* **23**(1).
- Benito, N., I. Mur, A. Ribera, A. Soriano, D. Rodriguez-Pardo, L. Sorli, J. Cobo, M. Fernandez-Sampedro, M. D. Del Toro, L. Guio, J. Praena, A. Bahamonde, M. Riera, J. Esteban, J. M. Baraia-Etxaburu, J. Martinez-Alvarez, A. Jover-Saenz, C. Duenas, A. Ramos, B. Sobrino, G. Euba, L. Morata, C. Pigrau, J. P. Horcajada, P. Coll, X. Crusi, J. Ariza and S. Reipi Group for the Study of Prosthetic Joint Infections / Geio (2019). "The Different Microbial Etiology of Prosthetic Joint

- Infections according to Route of Acquisition and Time after Prosthesis Implantation, Including the Role of Multidrug-Resistant Organisms." *J Clin Med* **8**(5).
- Bernhardt, H., M. Knoke and J. Bernhardt (2003). "Changes in *Candida albicans* colonization and morphology under influence of voriconazole." *Mycoses* **46**(9-10): 370-374.
- Beyda, N. D., R. E. Lewis and K. W. Garey (2012). "Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches." *Ann Pharmacother* **46**(7-8): 1086-1096.
- Bjarnsholt, T., M. Alhede, M. Alhede, S. R. Eickhardt-Sorensen, C. Moser, M. Kuhl, P. O. Jensen and N. Hoiby (2013). "The in vivo biofilm." *Trends Microbiol* **21**(9): 466-474.
- Bolbasov, E. N., P. V. Maryin, K. S. Stankevich, A. I. Kozelskaya, E. V. Shesterikov, Y. I. Khodyrevskaya, M. V. Nasonova, D. K. Shishkova, Y. A. Kudryavtseva, Y. G. Anissimov and S. I. Tverdokhlebov (2018). "Surface modification of electrospun poly-(l-lactic) acid scaffolds by reactive magnetron sputtering." *Colloids Surf B Biointerfaces* **162**: 43-51.
- Bongomin, F., S. Gago, R. O. Oladele and D. W. Denning (2017). "Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision." *J Fungi (Basel)* **3**(4).
- Borman, A. M., A. Szekely and E. M. Johnson (2017). "Isolates of the emerging pathogen *Candida auris* present in the UK have several geographic origins." *Med Mycol* **55**(5): 563-567.
- Bouza, E., J. Guinea and M. Guembe (2014). "The Role of Antifungals against *Candida* Biofilm in Catheter-Related Candidemia." *Antibiotics (Basel)* **4**(1): 1-17.
- Bouza, E. and P. Munoz (2008). "Epidemiology of candidemia in intensive care units." *Int J Antimicrob Agents* **32 Suppl 2**: S87-91.
- Brown, G. D., D. W. Denning and S. M. Levitz (2012). "Tackling human fungal infections." *Science* **336**(6082): 647.
- Buu, L. M. and Y. C. Chen (2014). "Impact of glucose levels on expression of hypha-associated secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*." *J Biomed Sci* **21**: 22.
- Cadnum, J. L., A. A. Shaikh, C. T. Piedrahita, T. Sankar, A. L. Jencson, E. L. Larkin, M. A. Ghannoum and C. J. Donskey (2017). "Effectiveness of Disinfectants Against *Candida auris* and Other *Candida* Species." *Infect Control Hosp Epidemiol* **38**(10): 1240-1243.
- Calderone, R. A. and W. A. Fonzi (2001). "Virulence factors of *Candida albicans*." *Trends Microbiol* **9**(7): 327-335.
- Calvo, B., A. S. Melo, A. Perozo-Mena, M. Hernandez, E. C. Francisco, F. Hagen, J. F. Meis and A. L. Colombo (2016). "First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia." *J Infect* **73**(4): 369-374.
- Canton, E., J. Peman, G. Quindos, E. Eraso, I. Miranda-Zapico, M. Alvarez, P. Merino, I. Campos-Herrero, F. Marco, E. G. de la Pedrosa, G. Yague, R. Guna, C. Rubio, C. Miranda, C. Pazos, D. Velasco and F. S. Group (2011). "Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia." *Antimicrob Agents Chemother* **55**(12): 5590-5596.
- Cardoso, M. V., J. de Rycker, A. Chaudhari, E. Coutinho, Y. Yoshida, B. Van Meerbeek, M. F. Mesquita, W. J. da Silva, K. Yoshihara, K. Vandamme and J. Duyck (2017). "Titanium implant functionalization with phosphate-containing polymers may favour in vivo osseointegration." *J Clin Periodontol* **44**(9): 950-960.
- Casadevall, A., D. P. Kontoyiannis and V. Robert (2019). "On the Emergence of *Candida auris*: Climate Change, Azoles, Swamps, and Birds." *MBio* **10**(4).
- Cavalheiro, M. and M. C. Teixeira (2018). "*Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies." *Front Med (Lausanne)* **5**: 28.
- Cendejas-Bueno, E., A. Kolecka, A. Alastruey-Izquierdo, B. Theelen, M. Groenewald, M. Kostrzewa, M. Cuenca-Estrella, A. Gomez-Lopez and T. Boekhout (2012). "Reclassification of the *Candida haemulonii* complex as *Candida haemulonii* (C. haemulonii group I), C. duobushaemulonii sp. nov. (C. haemulonii group II), and C. haemulonii var. vulnera var. nov.: three multiresistant human pathogenic yeasts." *J Clin Microbiol* **50**(11): 3641-3651.

8. Bibliografía

- Ceri, H., M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck and A. Buret (1999). "The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms." *J Clin Microbiol* **37**(6): 1771-1776.
- Coad, B. R., S. E. Kidd, D. H. Ellis and H. J. Griesser (2014). "Biomaterials surfaces capable of resisting fungal attachment and biofilm formation." *Biotechnol Adv* **32**(2): 296-307.
- Cornely, O. A., M. Bassetti, T. Calandra, J. Garbino, B. J. Kullberg, O. Lortholary, W. Meersseman, M. Akova, M. C. Arendrup, S. Arkan-Akdagli, J. Bille, E. Castagnola, M. Cuenca-Estrella, J. P. Donnelly, A. H. Groll, R. Herbrecht, W. W. Hope, H. E. Jensen, C. Lass-Flörl, G. Petrikos, M. D. Richardson, E. Roilides, P. E. Verweij, C. Viscoli, A. J. Ullmann and E. F. I. S. Group (2012). "ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: non-neutropenic adult patients." *Clin Microbiol Infect* **18 Suppl 7**: 19-37.
- Cornely, O. A., J. Vazquez, J. De Waele, R. Betts, C. Rotstein, M. Nucci, P. G. Pappas and A. J. Ullmann (2014). "Efficacy of micafungin in invasive candidiasis caused by common Candida species with special emphasis on non-albicans Candida species." *Mycoses* **57**(2): 79-89.
- Costerton, B. (2004). "Microbial ecology comes of age and joins the general ecology community." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(49): 16983-16984.
- Costerton, J. W. (1995). "Overview of microbial biofilms." *J Ind Microbiol* **15**(3): 137-140.
- Cunningham, B., A. C. McLaren, C. Pauken and R. McLemore (2012). "Liposomal formulation increases local delivery of amphotericin from bone cement: a pilot study." *Clin Orthop Relat Res* **470**(10): 2671-2676.
- Chaffin, W. L., J. L. Lopez-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo and J. P. Martinez (1998). "Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(1): 130-180.
- Chakrabarti, A. (2005). "Microbiology of systemic fungal infections." *J Postgrad Med* **51 Suppl 1**: S16-20.
- Chandra, J., D. M. Kuhn, P. K. Mukherjee, L. L. Hoyer, T. McCormick and M. A. Ghannoum (2001). "Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance." *J Bacteriol* **183**(18): 5385-5394.
- Chatterjee, S., S. V. Alampalli, R. K. Nageshan, S. T. Chettiar, S. Joshi and U. S. Tatu (2015). "Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*." *BMC Genomics* **16**: 686.
- Chen, H., M. Fujita, Q. Feng, J. Clardy and G. R. Fink (2004). "Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(14): 5048-5052.
- Chen, S. C., D. Marriott, E. G. Playford, Q. Nguyen, D. Ellis, W. Meyer, T. C. Sorrell, M. Slavin and S. Australian Candidaemia (2009). "Candidaemia with uncommon *Candida* species: predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management." *Clin Microbiol Infect* **15**(7): 662-669.
- Chowdhary, A., V. Anil Kumar, C. Sharma, A. Prakash, K. Agarwal, R. Babu, K. R. Dinesh, S. Karim, S. K. Singh, F. Hagen and J. F. Meis (2014). "Multidrug-resistant endemic clonal strain of *Candida auris* in India." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**(6): 919-926.
- Chowdhary, A., A. Prakash, C. Sharma, M. Kordalewska, A. Kumar, S. Sarma, B. Tarai, A. Singh, G. Upadhyaya, S. Upadhyay, P. Yadav, P. K. Singh, V. Khillan, N. Sachdeva, D. S. Perlin and J. F. Meis (2018). "A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009-17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance." *J Antimicrob Chemother* **73**(4): 891-899.
- Chu, V. H. (2018). "Device-Associated Infections." *Infect Dis Clin North Am* **32**(4): ix-x.
- Davey, M. E. and A. O'Toole G (2000). "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(4): 847-867.
- De-la-Fuente, M., M. Martinez-Perez, I. Gonzalez-Pallares and J. Esteban (2015). "Detection of Polyclonality among Clinical Isolates from Prosthetic Joint Infections." *J Clin Microbiol* **53**(12): 3766-3772.

- Ding, C. and G. Butler (2007). "Development of a gene knockout system in *Candida parapsilosis* reveals a conserved role for BCR1 in biofilm formation." *Eukaryot Cell* **6**(8): 1310-1319.
- Dominguez, E. G., R. Zarnowski, H. L. Choy, M. Zhao, H. Sanchez, J. E. Nett and D. R. Andes (2019). "Conserved Role for Biofilm Matrix Polysaccharides in *Candida auris* Drug Resistance." *mSphere* **4**(1).
- Donlan, R. M. (2001). "Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process." *Clin Infect Dis* **33**(8): 1387-1392.
- Dudiuk, C., I. Berrio, F. Leonardelli, S. Morales-Lopez, L. Theill, D. Macedo, J. Yesid-Rodriguez, S. Salcedo, A. Marin, S. Gamarra and G. Garcia-Effron (2019). "Antifungal activity and killing kinetics of anidulafungin, caspofungin and amphotericin B against *Candida auris*." *J Antimicrob Chemother* **74**(8): 2295-2302.
- Eggimann, P., J. Garbino and D. Pittet (2003). "Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients." *Lancet Infect Dis* **3**(11): 685-702.
- Eggimann, P. and D. Pittet (2014). "*Candida* colonization index and subsequent infection in critically ill surgical patients: 20 years later." *Intensive Care Med* **40**(10): 1429-1448.
- Ene, I. V. and R. J. Bennett (2009). "Hwp1 and related adhesins contribute to both mating and biofilm formation in *Candida albicans*." *Eukaryot Cell* **8**(12): 1909-1913.
- Enger, L., S. Joly, C. Pujol, P. Simonson, M. Pfaller and D. R. Soll (2001). "Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*." *J Clin Microbiol* **39**(2): 658-669.
- Erwig, L. P. and N. A. Gow (2016). "Interactions of fungal pathogens with phagocytes." *Nat Rev Microbiol* **14**(3): 163-176.
- Espinel-Ingroff, A. (2009). "Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009)." *Rev Iberoam Micol* **26**(1): 15-22.
- Espinel-Ingroff, A., M. Arendrup, E. Canton, S. Cordoba, E. Dannaoui, J. Garcia-Rodriguez, G. M. Gonzalez, N. P. Govender, E. Martin-Mazuelos, M. Lackner, C. Lass-Flörl, M. J. Linares Sicilia, M. A. Rodriguez-Iglesias, T. Pelaez, R. K. Shields, G. Garcia-Effron, J. Guinea, M. Sanguinetti and J. Turnidge (2017). "Multicenter Study of Method-Dependent Epidemiological Cutoff Values for Detection of Resistance in *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. to Amphotericin B and Echinocandins for the Etest Agar Diffusion Method." *Antimicrob Agents Chemother* **61**(1).
- EUCAST (2018). "Clinical breakpoints for fungi v 9.0."
- Falagas, M. E., N. Roussos and K. Z. Vardakas (2010). "Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review." *Int J Infect Dis* **14**(11): e954-966.
- Faustini, M., D. R. Ceratti, B. Louis, M. Boudot, P. A. Albouy, C. Boissiere and D. Grosso (2014). "Engineering functionality gradients by dip coating process in acceleration mode." *ACS Appl Mater Interfaces* **6**(19): 17102-17110.
- Finkel, J. S. and A. P. Mitchell (2011). "Genetic control of *Candida albicans* biofilm development." *Nat Rev Microbiol* **9**(2): 109-118.
- Fuchs, B. B., J. Eby, C. J. Nobile, J. B. El Khoury, A. P. Mitchell and E. Mylonakis (2010). "Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*." *Microbes Infect* **12**(6): 488-496.
- Garcia-Casas, A., J. J. Aguilera-Correa, A. Mediero, J. Esteban and A. Jimenez-Morales (2019). "Functionalization of sol-gel coatings with organophosphorus compounds for prosthetic devices." *Colloids Surf B Biointerfaces* **181**: 973-980.
- Garcia-Effron, G., S. K. Katiyar, S. Park, T. D. Edlind and D. S. Perlin (2008). "A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(7): 2305-2312.
- Garcia-Vidal, C., D. Viasus and J. Carratala (2013). "Pathogenesis of invasive fungal infections." *Curr Opin Infect Dis* **26**(3): 270-276.

8. Bibliografía

- Geller, J. A., K. P. MacCallum, T. S. Murtaugh, D. A. Patrick, Jr., B. Liabaud and V. K. Jonna (2016). "Prospective Comparison of Blood Culture Bottles and Conventional Swabs for Microbial Identification of Suspected Periprosthetic Joint Infection." J Arthroplasty **31**(8): 1779-1783.
- Gendreau, L. and Z. G. Loewy (2011). "Epidemiology and etiology of denture stomatitis." J Prosthodont **20**(4): 251-260.
- Glassman, A. H., R. D. Crowninshield, R. Schenck and P. Herberts (2001). "A low stiffness composite biologically fixed prosthesis." Clin Orthop Relat Res(393): 128-136.
- Gow, N. A., F. L. van de Veerdonk, A. J. Brown and M. G. Netea (2011). "Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization." Nat Rev Microbiol **10**(2): 112-122.
- Gristina, A. G. (1987). "Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration." Science **237**(4822): 1588-1595.
- Guery, B. P., M. C. Arendrup, G. Auzinger, E. Azoulay, M. Borges Sa, E. M. Johnson, E. Muller, C. Putensen, C. Rotstein, G. Sganga, M. Venditti, R. Zaragoza Crespo and B. J. Kullberg (2009). "Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis." Intensive Care Med **35**(1): 55-62.
- Gunther, G. R., J. L. Wang, I. Yahara, B. A. Cunningham and G. M. Edelman (1973). "Concanavalin A derivatives with altered biological activities." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(4): 1012-1016.
- Hagerty, J. A., J. Ortiz, D. Reich and C. Manzarbeitia (2003). "Fungal infections in solid organ transplant patients." Surg Infect (Larchmt) **4**(3): 263-271.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton and P. Stoodley (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." Nat Rev Microbiol **2**(2): 95-108.
- Hargarten, J. C., T. C. Moore, T. M. Petro, K. W. Nickerson and A. L. Atkin (2015). "Candida albicans Quorum Sensing Molecules Stimulate Mouse Macrophage Migration." Infect Immun **83**(10): 3857-3864.
- He, X. Y., J. H. Meurman, K. Kari, R. Rautemaa and L. P. Samaranayake (2006). "In vitro adhesion of Candida species to denture base materials." Mycoses **49**(2): 80-84.
- Heinemann, V., D. Bosse, U. Jehn, B. Kahny, K. Wachholz, A. Debus, P. Scholz, H. J. Kolb and W. Wilmanns (1997). "Pharmacokinetics of liposomal amphotericin B (Ambisome) in critically ill patients." Antimicrob Agents Chemother **41**(6): 1275-1280.
- Henriques, M., J. Azeredo and R. Oliveira (2006). "Candida species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used." Crit Rev Microbiol **32**(4): 217-226.
- Hitchcock, C. A., N. J. Russell and K. J. Barrett-Bee (1987). "Sterols in Candida albicans mutants resistant to polyene or azole antifungals, and of a double mutant C. albicans 6.4." Crit Rev Microbiol **15**(1): 111-115.
- Hornby, J. M., E. C. Jensen, A. D. Lisec, J. J. Tasto, B. Jahnke, R. Shoemaker, P. Dussault and K. W. Nickerson (2001). "Quorum sensing in the dimorphic fungus Candida albicans is mediated by farnesol." Appl Environ Microbiol **67**(7): 2982-2992.
- Hoyer, L. L., C. B. Green, S. H. Oh and X. Zhao (2008). "Discovering the secrets of the Candida albicans agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit." Med Mycol **46**(1): 1-15.
- Hua, X., X. Yuan, B. M. Mitchell, M. C. Lorenz, D. M. O'Day and K. R. Wilhelmus (2009). "Morphogenic and genetic differences between Candida albicans strains are associated with keratomycosis virulence." Mol Vis **15**: 1476-1484.
- Ikeh, M., Y. Ahmed and J. Quinn (2017). "Phosphate Acquisition and Virulence in Human Fungal Pathogens." Microorganisms **5**(3).
- Jaffer, I. H., J. C. Fredenburgh, J. Hirsh and J. I. Weitz (2015). "Medical device-induced thrombosis: what causes it and how can we prevent it?" J Thromb Haemost **13** Suppl 1: S72-81.

- Jakobs, O., B. Schoof, T. O. Klatte, S. Schmidl, F. Fensky, D. Guenther, L. Frommelt, T. Gehrke and M. Gebauer (2015). "Fungal periprosthetic joint infection in total knee arthroplasty: a systematic review." Orthop Rev (Pavia) **7**(1): 5623.
- Jigami, Y. and T. Odani (1999). "Mannosylphosphate transfer to yeast mannan." Biochim Biophys Acta **1426**(2): 335-345.
- Kaneko, Y., S. Miyagawa, O. Takeda, M. Hakariya, S. Matsumoto, H. Ohno and Y. Miyazaki (2013). "Real-time microscopic observation of Candida biofilm development and effects due to micafungin and fluconazole." Antimicrob Agents Chemother **57**(5): 2226-2230.
- Kean, R., C. Delaney, R. Rajendran, L. Sherry, R. Metcalfe, R. Thomas, W. McLean, C. Williams and G. Ramage (2018). "Gaining Insights from Candida Biofilm Heterogeneity: One Size Does Not Fit All." J Fungi (Basel) **4**(1).
- Kelly, S. L., D. C. Lamb, D. E. Kelly, N. J. Manning, J. Loeffler, H. Hebart, U. Schumacher and H. Einsele (1997). "Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in Candida albicans from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation." FEBS Lett **400**(1): 80-82.
- Kim, C. K., M. J. Karau, K. E. Greenwood-Quaintance, A. Y. Tilahun, C. S. David, J. N. Mandrekar, R. Patel and G. Rajagopalan (2015). "Superantigens in Staphylococcus aureus isolated from prosthetic joint infection." Diagn Microbiol Infect Dis **81**(3): 201-207.
- Kinnari, T. J., J. Esteban, N. Zamora, R. Fernandez, C. Lopez-Santos, F. Yubero, D. Mariscal, J. A. Puertolas and E. Gomez-Barrena (2010). "Effect of surface roughness and sterilization on bacterial adherence to ultra-high molecular weight polyethylene." Clin Microbiol Infect **16**(7): 1036-1041.
- Klotz, S. A., D. J. Drutz and J. E. Zajic (1985). "Factors governing adherence of Candida species to plastic surfaces." Infect Immun **50**(1): 97-101.
- Kohli, A., Smriti, K. Mukhopadhyay, A. Rattan and R. Prasad (2002). "In vitro low-level resistance to azoles in Candida albicans is associated with changes in membrane lipid fluidity and asymmetry." Antimicrob Agents Chemother **46**(4): 1046-1052.
- Kojic, E. M. and R. O. Darouiche (2004). "Candida infections of medical devices." Clin Microbiol Rev **17**(2): 255-267.
- Kordalewska, M. and D. S. Perlin (2019). "Molecular Diagnostics in the Times of Surveillance for Candida auris." J Fungi (Basel) **5**(3).
- Krcmery, V. and A. J. Barnes (2002). "Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance." J Hosp Infect **50**(4): 243-260.
- Kucharikova, S., H. Tournu, K. Lagrou, P. Van Dijck and H. Bujdakova (2011). "Detailed comparison of Candida albicans and Candida glabrata biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin." J Med Microbiol **60**(Pt 9): 1261-1269.
- Kuhn, D. M., T. George, J. Chandra, P. K. Mukherjee and M. A. Ghannoum (2002). "Antifungal susceptibility of Candida biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins." Antimicrob Agents Chemother **46**(6): 1773-1780.
- Kuhn, D. M. and M. A. Ghannoum (2004). "Candida biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options." Curr Opin Investig Drugs **5**(2): 186-197.
- Kuiper, J. W., M. P. van den Bekerom, J. van der Stappen, P. A. Nolte and S. Colen (2013). "2-stage revision recommended for treatment of fungal hip and knee prosthetic joint infections." Acta Orthop **84**(6): 517-523.
- Kullberg, B. J. and M. C. Arendrup (2015). "Invasive Candidiasis." N Engl J Med **373**(15): 1445-1456.
- Kumar, D., T. Banerjee, C. B. Pratap and R. Tilak (2015). "Itraconazole-resistant Candida auris with phospholipase, proteinase and hemolysin activity from a case of vulvovaginitis." J Infect Dev Ctries **9**(4): 435-437.
- Kumeria, T., H. Mon, M. S. Aw, K. Gulati, A. Santos, H. J. Griesser and D. Losic (2015). "Advanced biopolymer-coated drug-releasing titania nanotubes (TNTs) implants with

8. Bibliografía

- simultaneously enhanced osteoblast adhesion and antibacterial properties." Colloids Surf B Biointerfaces **130**: 255-263.
- Kuo, F. C., K. Goswami, N. Shohat, K. Blevins, A. J. Rondon and J. Parvizi (2018). "Two-Stage Exchange Arthroplasty Is a Favorable Treatment Option Upon Diagnosis of a Fungal Periprosthetic Joint Infection." J Arthroplasty **33**(11): 3555-3560.
- Kurtz, S. M., E. Lau, H. Watson, J. K. Schmier and J. Parvizi (2012). "Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States." J Arthroplasty **27**(8 Suppl): 61-65 e61.
- LaFleur, M. D., C. A. Kumamoto and K. Lewis (2006). "Candida albicans biofilms produce antifungal-tolerant persister cells." Antimicrob Agents Chemother **50**(11): 3839-3846.
- Larkin, E., C. Hager, J. Chandra, P. K. Mukherjee, M. Retuerto, I. Salem, L. Long, N. Isham, L. Kovanda, K. Borroto-Esoda, S. Wring, D. Angulo and M. Ghannoum (2017). "The Emerging Pathogen Candida auris: Growth Phenotype, Virulence Factors, Activity of Antifungals, and Effect of SCY-078, a Novel Glucan Synthesis Inhibitor, on Growth Morphology and Biofilm Formation." Antimicrob Agents Chemother **61**(5).
- Lattif, A. A., P. K. Mukherjee, J. Chandra, K. Swindell, S. R. Lockhart, D. J. Diekema, M. A. Pfaller and M. A. Ghannoum (2010). "Characterization of biofilms formed by Candida parapsilosis, C. metapsilosis, and C. orthopsilosis." Int J Med Microbiol **300**(4): 265-270.
- Lee, W. G., J. H. Shin, Y. Uh, M. G. Kang, S. H. Kim, K. H. Park and H. C. Jang (2011). "First three reported cases of nosocomial fungemia caused by Candida auris." J Clin Microbiol **49**(9): 3139-3142.
- Lepak, A. J., M. Zhao, E. L. Berkow, S. R. Lockhart and D. R. Andes (2017). "Pharmacodynamic Optimization for Treatment of Invasive Candida auris Infection." Antimicrob Agents Chemother **61**(8).
- Li, F. and S. P. Palecek (2008). "Distinct domains of the Candida albicans adhesin Eap1p mediate cell-cell and cell-substrate interactions." Microbiology **154**(Pt 4): 1193-1203.
- Liu, P., M. Ruhnke, W. Meersseman, J. A. Paiva, M. Kantecki and B. Damle (2013). "Pharmacokinetics of anidulafungin in critically ill patients with candidemia/invasive candidiasis." Antimicrob Agents Chemother **57**(4): 1672-1676.
- Lockhart, S. R., E. L. Berkow, N. Chow and R. M. Welsh (2017). "Candida auris for the clinical microbiology laboratory: Not your grandfather's Candida species." Clin Microbiol News **39**(13): 99-103.
- Lockhart, S. R., K. A. Etienne, S. Vallabhaneni, J. Farooqi, A. Chowdhary, N. P. Govender, A. L. Colombo, B. Calvo, C. A. Cuomo, C. A. Desjardins, E. L. Berkow, M. Castanheira, R. E. Magobo, K. Jabeen, R. J. Asghar, J. F. Meis, B. Jackson, T. Chiller and A. P. Litvintseva (2017). "Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant Candida auris on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses." Clin Infect Dis **64**(2): 134-140.
- Loh, J. M., N. Adenwalla, S. Wiles and T. Proft (2013). "Galleria mellonella larvae as an infection model for group A streptococcus." Virulence **4**(5): 419-428.
- Lortholary, O., M. Desnos-Ollivier, K. Sitbon, A. Fontanet, S. Bretagne, F. Dromer and G. French Mycosis Study (2011). "Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients." Antimicrob Agents Chemother **55**(2): 532-538.
- Louie, A., Q. F. Liu, G. L. Drusano, W. Liu, M. Mayers, E. Anaissie and M. H. Miller (1998). "Pharmacokinetic studies of fluconazole in rabbits characterizing doses which achieve peak levels in serum and area under the concentration-time curve values which mimic those of high-dose fluconazole in humans." Antimicrob Agents Chemother **42**(6): 1512-1514.
- Lu, A., Q. Zhang, J. Zhang, B. Yang, K. Wu, W. Xie, Y. X. Luan and E. Ling (2014). "Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity." Front Physiol **5**: 252.
- M. C. Arendrup JM, J. W. M., K. Lagrou, Petr Hamal, J Guinea and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2017). Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. 2017.

- Mahmoodian, M., A. B. Arya and B. Pourabbas (2008). "Synthesis of organic-inorganic hybrid compounds based on Bis-GMA and its sol-gel behavior analysis using Taguchi method." Dent Mater **24**(4): 514-521.
- Mahmoudi, S., S. Agha Kuchak Afshari, S. Aghaei Gharehbolagh, H. Mirhendi and K. Makimura (2019). "Methods for identification of *Candida auris*, the yeast of global public health concern: A review." J Mycol Med **29**(2): 174-179.
- Mandakhalikar, K. D., J. N. Rahmat, E. Chiong, K. G. Neoh, L. Shen and P. A. Tambyah (2018). "Extraction and quantification of biofilm bacteria: Method optimized for urinary catheters." Sci Rep **8**(1): 8069.
- Martinez-Moreno, J., V. Merino, A. Nacher, J. L. Rodrigo, M. Climente and M. Merino-Sanjuan (2017). "Antibiotic-loaded Bone Cement as Prophylaxis in Total Joint Replacement." Orthop Surg **9**(4): 331-341.
- Martins, M., P. Uppuluri, D. P. Thomas, I. A. Cleary, M. Henriques, J. L. Lopez-Ribot and R. Oliveira (2010). "Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms." Mycopathologia **169**(5): 323-331.
- McCarthy, M. (2016). "Hospital transmitted *Candida auris* infections confirmed in the US." BMJ **355**: i5978.
- McConoughey, S. J., R. P. Howlin, J. Wiseman, P. Stoodley and J. H. Calhoun (2015). "Comparing PMMA and calcium sulfate as carriers for the local delivery of antibiotics to infected surgical sites." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **103**(4): 870-877.
- Melo, A. S., A. L. Colombo and B. A. Arthington-Skaggs (2007). "Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species." Antimicrob Agents Chemother **51**(9): 3081-3088.
- Merseguel, K. B., A. S. Nishikaku, A. M. Rodrigues, A. C. Padovan, R. C. e Ferreira, A. S. de Azevedo Melo, M. R. Briones and A. L. Colombo (2015). "Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection." BMC Infect Dis **15**: 57.
- Mesa-Arango, A. C., N. Trevijano-Contador, E. Roman, R. Sanchez-Fresneda, C. Casas, E. Herrero, J. C. Arguelles, J. Pla, M. Cuenca-Estrella and O. Zaragoza (2014). "The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug." Antimicrob Agents Chemother **58**(11): 6627-6638.
- Mille, C., G. Janbon, F. Delplace, S. Ibat-Ombetta, C. Gaillardin, G. Strecker, T. Jouault, P. A. Trinel and D. Poulain (2004). "Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation." J Biol Chem **279**(46): 47952-47960.
- Minagi, S., Y. Miyake, K. Inagaki, H. Tsuru and H. Suganaka (1985). "Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials." Infect Immun **47**(1): 11-14.
- Monroe, D. (2007). "Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms." PLoS Biol **5**(11): e307.
- Monroy-Perez, E., G. L. Paniagua-Contreras, P. Rodriguez-Purata, F. Vaca-Paniagua, M. Vazquez-Villasenor, C. Diaz-Velasquez, A. Uribe-Garcia and S. Vaca (2016). "High Virulence and Antifungal Resistance in Clinical Strains of *Candida albicans*." Can J Infect Dis Med Microbiol **2016**: 5930489.
- Mowlds, P. and K. Kavanagh (2008). "Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*." Mycopathologia **165**(1): 5-12.
- Moyes, D. L., J. P. Richardson and J. R. Naglik (2015). "Candida albicans-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface." Virulence **6**(4): 338-346.
- Mukherjee, P. K., D. V. Chand, J. Chandra, J. M. Anderson and M. A. Ghannoum (2009). "Shear stress modulates the thickness and architecture of *Candida albicans* biofilms in a phase-dependent manner." Mycoses **52**(5): 440-446.

8. Bibliografía

- Mukherjee, P. K., J. Chandra, D. M. Kuhn and M. A. Ghannoum (2003). "Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols." *Infect Immun* **71**(8): 4333-4340.
- Munoz, J. F., L. Gade, N. A. Chow, V. N. Loparev, P. Juieng, E. L. Berkow, R. A. Farrer, A. P. Litvintseva and C. A. Cuomo (2018). "Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in *Candida auris* and related emerging species." *Nat Commun* **9**(1): 5346.
- Munro, C. A., S. Selvaggini, I. de Bruijn, L. Walker, M. D. Lenardon, B. Gerssen, S. Milne, A. J. Brown and N. A. Gow (2007). "The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*." *Mol Microbiol* **63**(5): 1399-1413.
- Nace, J., A. Siddiqi, C. T. Talmo and A. F. Chen (2019). "Diagnosis and Management of Fungal Periprosthetic Joint Infections." *J Am Acad Orthop Surg* **27**(18): e804-e818.
- Nadeem, S. G., S. T. Hakim and S. U. Kazmi (2010). "Use of CHROMagar *Candida* for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings." *Libyan J Med* **5**.
- Nett, J. E., K. Crawford, K. Marchillo and D. R. Andes (2010). "Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene." *Antimicrob Agents Chemother* **54**(8): 3505-3508.
- Nett, J. E., H. Sanchez, M. T. Cain and D. R. Andes (2010). "Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan." *J Infect Dis* **202**(1): 171-175.
- Nikawa, H., K. Ishida, T. Hamada, T. Satoda, T. Murayama, T. Takemoto, M. Tamamoto, H. Tajima, S. Shimoe, H. Fujimoto and S. Makihiro (2005). "Immobilization of octadecyl ammonium chloride on the surface of titanium and its effect on microbial colonization in vitro." *Dent Mater J* **24**(4): 570-582.
- Nobile, C. J., J. E. Nett, D. R. Andes and A. P. Mitchell (2006). "Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation." *Eukaryot Cell* **5**(10): 1604-1610.
- Nucci, M. and A. L. Colombo (2007). "Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals." *Diagn Microbiol Infect Dis* **58**(1): 77-82.
- Odds, F. C. (1984). "Ecology and epidemiology of *Candida* species." *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* **257**(2): 207-212.
- Odds, F. C., A. J. Brown and N. A. Gow (2003). "Antifungal agents: mechanisms of action." *Trends Microbiol* **11**(6): 272-279.
- Page, B., M. Page and C. Noel (1993). "A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro." *Int J Oncol* **3**(3): 473-476.
- Panagoda, G. J., A. N. Ellepola and L. P. Samaranayake (2001). "Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity." *Mycoses* **44**(1-2): 29-35.
- Pappas, P. G., C. A. Kauffman, D. R. Andes, C. J. Clancy, K. A. Marr, L. Ostrosky-Zeichner, A. C. Reboli, M. G. Schuster, J. A. Vazquez, T. J. Walsh, T. E. Zaoutis and J. D. Sobel (2016). "Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America." *Clin Infect Dis* **62**(4): e1-50.
- Patterson, T. F. (2003). "Combination antifungal therapy." *Pediatr Infect Dis J* **22**(6): 555-556.
- Paulo, C. S., M. Vidal and L. S. Ferreira (2010). "Antifungal nanoparticles and surfaces." *Biomacromolecules* **11**(10): 2810-2817.
- Peeters, E., H. J. Nelis and T. Coenye (2008). "Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates." *J Microbiol Methods* **72**(2): 157-165.
- Pereira, L., S. Silva, B. Ribeiro, M. Henriques and J. Azeredo (2015). "Influence of glucose concentration on the structure and quantity of biofilms formed by *Candida parapsilosis*." *FEMS Yeast Res* **15**(5): fov043.

- Perez-Jorge, C., M. A. Arenas, A. Conde, J. M. Hernandez-Lopez, J. J. de Damborenea, S. Fisher, A. M. Hunt, J. Esteban and G. James (2017). "Bacterial and fungal biofilm formation on anodized titanium alloys with fluorine." *J Mater Sci Mater Med* **28**(1): 8.
- Perumal, P., S. Mekala and W. L. Chaffin (2007). "Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(7): 2454-2463.
- Pfaller, M., L. Boyken, R. Hollis, J. Kroeger, S. Messer, S. Tendolkar and D. Diekema (2011). "Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Candida* species to anidulafungin, caspofungin, and micafungin." *J Clin Microbiol* **49**(2): 624-629.
- Pfaller, M. A. and D. J. Diekema (2007). "Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem." *Clin Microbiol Rev* **20**(1): 133-163.
- Pfaller, M. A., G. J. Moet, S. A. Messer, R. N. Jones and M. Castanheira (2011). "Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009)." *J Clin Microbiol* **49**(1): 396-399.
- Piedrahita, C. T., J. L. Cadnum, A. L. Jencson, A. A. Shaikh, M. A. Ghannoum and C. J. Donskey (2017). "Environmental Surfaces in Healthcare Facilities are a Potential Source for Transmission of *Candida auris* and Other *Candida* Species." *Infect Control Hosp Epidemiol* **38**(9): 1107-1109.
- Pittrow, L. and A. Penk (1997). "Plasma and tissue concentrations of fluconazole and their correlation to breakpoints." *Mycoses* **40**(1-2): 25-32.
- Playford, E. G., D. Marriott, Q. Nguyen, S. Chen, D. Ellis, M. Slavin and T. C. Sorrell (2008). "Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: risk factors for non-*albicans* *Candida* spp." *Crit Care Med* **36**(7): 2034-2039.
- Pryszcz, L. P., T. Nemeth, A. Gacser and T. Gabaldon (2013). "Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*." *Genome Biol Evol* **5**(12): 2382-2392.
- Ramage, G., J. P. Martinez and J. L. Lopez-Ribot (2006). "Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem." *FEMS Yeast Res* **6**(7): 979-986.
- Ramage, G., S. P. Saville, B. L. Wickes and J. L. Lopez-Ribot (2002). "Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule." *Appl Environ Microbiol* **68**(11): 5459-5463.
- Repp, K. K., S. A. Menor and R. K. Pettit (2007). "Microplate Alamar blue assay for susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms." *Med Mycol* **45**(7): 603-607.
- Rochford, E. T., R. G. Richards and T. F. Moriarty (2012). "Influence of material on the development of device-associated infections." *Clin Microbiol Infect* **18**(12): 1162-1167.
- Rodrigues, C. F., M. E. Rodrigues and M. Henriques (2018). "Susceptibility of *Candida glabrata* biofilms to echinocandins: alterations in the matrix composition." *Biofouling* **34**(5): 569-578.
- Rohde, H., E. C. Burandt, N. Siemssen, L. Frommelt, C. Burdelski, S. Wurster, S. Scherpe, A. P. Davies, L. G. Harris, M. A. Horstkotte, J. K. Knobloch, C. Ragunath, J. B. Kaplan and D. Mack (2007). "Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections." *Biomaterials* **28**(9): 1711-1720.
- Romera, D., J. J. Aguilera-Correa, I. Gadea, L. Vinuela-Sandoval, J. Garcia-Rodriguez and J. Esteban (2019). "Candida auris: a comparison between planktonic and biofilm susceptibility to antifungal drugs." *J Med Microbiol* **68**(9): 1353-1358.
- Ruiz Gaitan, A. C., A. Moret, J. L. Lopez Hontangas, J. M. Molina, A. I. Aleixandre Lopez, A. H. Cabezas, J. Mollar Maseres, R. C. Arcas, M. D. Gomez Ruiz, M. A. Chiveli, E. Canton and J. Peman (2017). "Nosocomial fungemia by *Candida auris*: First four reported cases in continental Europe." *Rev Iberoam Micol* **34**(1): 23-27.
- Sam, Q. H., M. W. Chang and L. Y. Chai (2017). "The Fungal Mycobiome and Its Interaction with Gut Bacteria in the Host." *Int J Mol Sci* **18**(2).
- Sangamwar, A. T., U. D. Deshpande and S. S. Pekamwar (2008). "Antifungals: need to search for a new molecular target." *Indian J Pharm Sci* **70**(4): 423-430.

8. Bibliografía

- Sanguinetti, M., B. Posteraro and C. Lass-Flörl (2015). "Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact." *Mycoses* **58 Suppl 2**: 2-13.
- Santana, I. L., L. M. Gonçalves, A. A. de Vasconcellos, W. J. da Silva, J. A. Cury and A. A. Del Bel Cury (2013). "Dietary carbohydrates modulate *Candida albicans* biofilm development on the denture surface." *PLoS One* **8**(5): e64645.
- Satoh, K., K. Makimura, Y. Hasumi, Y. Nishiyama, K. Uchida and H. Yamaguchi (2009). "*Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital." *Microbiol Immunol* **53**(1): 41-44.
- Schaefer, D. W., C. J. Brinker, D. Richter, B. Farago and B. Frick (1990). "Dynamics of weakly connected solids: Silica aerogels." *Phys Rev Lett* **64**(19): 2316-2319.
- Schelenz, S., F. Hagen, J. L. Rhodes, A. Abdolrasouli, A. Chowdhary, A. Hall, L. Ryan, J. Shackleton, R. Trimlett, J. F. Meis, D. Armstrong-James and M. C. Fisher (2016). "First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital." *Antimicrob Resist Infect Control* **5**: 35.
- Schierholz, J. M. and J. Beuth (2001). "Implant infections: a haven for opportunistic bacteria." *J Hosp Infect* **49**(2): 87-93.
- Schoof, B., O. Jakobs, S. Schmidl, T. O. Klatte, L. Frommelt, T. Gehrke and M. Gebauer (2015). "Fungal periprosthetic joint infection of the hip: a systematic review." *Orthop Rev (Pavia)* **7**(1): 5748.
- Sharan, J., V. Koul, A. K. Dinda, O. P. Kharbanda, S. V. Lale, R. Duggal, M. Mishra, G. Gupta and M. P. Singh (2018). "Bio-functionalization of grade V titanium alloy with type I human collagen for enhancing and promoting human periodontal fibroblast cell adhesion - an in-vitro study." *Colloids Surf B Biointerfaces* **161**: 1-9.
- Sharma, C., N. Kumar, R. Pandey, J. F. Meis and A. Chowdhary (2016). "Whole genome sequencing of emerging multidrug resistant *Candida auris* isolates in India demonstrates low genetic variation." *New Microbes New Infect* **13**: 77-82.
- Sheehan, G. and K. Kavanagh (2018). "Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*." *Virulence* **9**(1): 163-172.
- Shepherd, M. G. (1987). "Cell envelope of *Candida albicans*." *Crit Rev Microbiol* **15**(1): 7-25.
- Sherry, L., G. Ramage, R. Kean, A. Borman, E. M. Johnson, M. D. Richardson and R. Rautemaa-Richardson (2017). "Biofilm-Forming Capability of Highly Virulent, Multidrug-Resistant *Candida auris*." *Emerg Infect Dis* **23**(2): 328-331.
- Siddiqi, A., N. E. George, P. B. White, B. W. Szczech, J. V. Thompson, J. I. Etcheson, C. U. Gwam, A. T. Caughran, R. E. Delanois and J. Nace (2018). "Articulating Spacers as a Modified One-Stage Revision Total Knee Arthroplasty: A Preliminary Analysis." *Surg Technol Int* **32**: 239-248.
- Silva-Dias, A., I. M. Miranda, J. Branco, M. Monteiro-Soares, C. Pina-Vaz and A. G. Rodrigues (2015). "Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp." *Front Microbiol* **6**: 205.
- Silva, S., M. Henriques, A. Martins, R. Oliveira, D. Williams and J. Azeredo (2009). "Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition." *Med Mycol* **47**(7): 681-689.
- Silva, S., M. Negri, M. Henriques, R. Oliveira, D. W. Williams and J. Azeredo (2012). "*Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance." *FEMS Microbiol Rev* **36**(2): 288-305.
- Srikantha, T., K. J. Daniels, C. Pujol, E. Kim and D. R. Soll (2013). "Identification of genes upregulated by the transcription factor Bcr1 that are involved in impermeability, impenetrability, and drug resistance of *Candida albicans* α /alpha biofilms." *Eukaryot Cell* **12**(6): 875-888.
- Sudbery, P. E. (2011). "Growth of *Candida albicans* hyphae." *Nat Rev Microbiol* **9**(10): 737-748.
- Sukhorukova, I. V., A. N. Sheveyko, P. V. Kiryukhantsev-Korneev, I. Y. Zhitnyak, N. A. Gloushankova, E. A. Denisenko, S. Y. Filippovich, S. G. Ignatov and D. V. Shtansky (2015). "Toward bioactive yet antibacterial surfaces." *Colloids Surf B Biointerfaces* **135**: 158-165.

- Swartjes, J. J., P. K. Sharma, T. G. van Kooten, H. C. van der Mei, M. Mahmoudi, H. J. Busscher and E. T. Rochford (2015). "Current Developments in Antimicrobial Surface Coatings for Biomedical Applications." *Curr Med Chem* **22**(18): 2116-2129.
- Talpaert, M. J., A. Balfour, S. Stevens, M. Baker, F. A. Muhlschlegel and C. W. Gourlay (2015). "Candida biofilm formation on voice prostheses." *J Med Microbiol* **64**(Pt 3): 199-208.
- Tande, A. J. and R. Patel (2014). "Prosthetic joint infection." *Clin Microbiol Rev* **27**(2): 302-345.
- Tarabichi, M., N. Shohat, K. Goswami, A. Alvand, R. Silibovsky, K. Belden and J. Parvizi (2018). "Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: The Potential of Next-Generation Sequencing." *J Bone Joint Surg Am* **100**(2): 147-154.
- Thewes, S., G. P. Moran, B. B. Magee, M. Schaller, D. J. Sullivan and B. Hube (2008). "Phenotypic screening, transcriptional profiling, and comparative genomic analysis of an invasive and non-invasive strain of *Candida albicans*." *BMC Microbiol* **8**: 187.
- Tibayrenc, M. (1997). "Are *Candida albicans* natural populations subdivided?" *Trends Microbiol* **5**(7): 253-254; discussion 254-257.
- Todd, B. (2017). "Clinical Alert: *Candida Auris*." *Am J Nurs* **117**(4): 53-55.
- Tragiannidis, A., C. Tsoulas and A. H. Groll (2015). "Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: update on current guidelines." *Mycoses* **58**(1): 10-21.
- Trofa, D., A. Gacser and J. D. Nosanchuk (2008). "*Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen." *Clin Microbiol Rev* **21**(4): 606-625.
- Tsai, C. J., J. M. Loh and T. Proft (2016). "*Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing." *Virulence* **7**(3): 214-229.
- Ueng, S. W., C. Y. Lee, C. C. Hu, P. H. Hsieh and Y. Chang (2013). "What is the success of treatment of hip and knee candidal periprosthetic joint infection?" *Clin Orthop Relat Res* **471**(9): 3002-3009.
- Uppuluri, P., A. K. Chaturvedi, A. Srinivasan, M. Banerjee, A. K. Ramasubramaniam, J. R. Kohler, D. Kadosh and J. L. Lopez-Ribot (2010). "Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle." *PLoS Pathog* **6**(3): e1000828.
- Uwamahoro, N., J. Verma-Gaur, H. H. Shen, Y. Qu, R. Lewis, J. Lu, K. Bamberg, S. L. Masters, J. E. Vince, T. Naderer and A. Traven (2014). "The pathogen *Candida albicans* hijacks pyroptosis for escape from macrophages." *MBio* **5**(2): e00003-00014.
- Vallabhaneni, S., A. Kallen, S. Tsay, N. Chow, R. Welsh, J. Kerins, S. K. Kembler, M. Pacilli, S. R. Black, E. Landon, J. Ridgway, T. N. Palmore, A. Zelzany, E. H. Adams, M. Quinn, S. Chaturvedi, J. Greenko, R. Fernandez, K. Southwick, E. Y. Furuya, D. P. Calfee, C. Hamula, G. Patel, P. Barrett, Msd, P. Lafaro, E. L. Berkow, H. Moulton-Meissner, J. Noble-Wang, R. P. Fagan, B. R. Jackson, S. R. Lockhart, A. P. Litvintseva and T. M. Chiller (2016). "Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus - United States, May 2013-August 2016." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **65**(44): 1234-1237.
- Van den Driessche, F., P. Rigole, G. Brackman and T. Coenye (2014). "Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms." *J Microbiol Methods* **98**: 31-34.
- Vazquez-Gonzalez, D., A. M. Perusquia-Ortiz, M. Hunderiker and A. Bonifaz (2013). "Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis." *J Dtsch Dermatol Ges* **11**(5): 381-393; quiz 394.
- Wachtler, B., F. Citiulo, N. Jablonowski, S. Forster, F. Dalle, M. Schaller, D. Wilson and B. Hube (2012). "*Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process." *PLoS One* **7**(5): e36952.
- Wang, X., J. Bing, Q. Zheng, F. Zhang, J. Liu, H. Yue, L. Tao, H. Du, Y. Wang, H. Wang and G. Huang (2018). "The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects." *Emerg Microbes Infect* **7**(1): 93.
- Weerasekera, M. M., G. K. Wijesinghe, T. A. Jayarathna, C. P. Gunasekara, N. Fernando, N. Kottegoda and L. P. Samaranayake (2016). "Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **111**(11): 697-702.

8. Bibliografía

- Weete, J. D., M. Abril and M. Blackwell (2010). "Phylogenetic distribution of fungal sterols." PLoS One **5**(5): e10899.
- Welsh, R. M., M. L. Bentz, A. Shams, H. Houston, A. Lyons, L. J. Rose and A. P. Litvintseva (2017). "Survival, Persistence, and Isolation of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yeast *Candida auris* on a Plastic Health Care Surface." J Clin Microbiol **55**(10): 2996-3005.
- White, T. C., K. A. Marr and R. A. Bowden (1998). "Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance." Clin Microbiol Rev **11**(2): 382-402.
- Wiederhold, N. P., S. R. Lockhart, L. K. Najvar, E. L. Berkow, R. Jaramillo, M. Olivo, E. P. Garvey, C. M. Yates, R. J. Schotzinger, G. Catano and T. F. Patterson (2019). "The Fungal Cyp51-Specific Inhibitor VT-1598 Demonstrates In Vitro and In Vivo Activity against *Candida auris*." Antimicrob Agents Chemother **63**(3).
- Wiegand, I., K. Hilpert and R. E. Hancock (2008). "Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances." Nat Protoc **3**(2): 163-175.
- Wilson, I. G. (1997). "Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification." Appl Environ Microbiol **63**(10): 3741-3751.
- Xie, Z., A. Thompson, T. Sobue, H. Kashleva, H. Xu, J. Vasilakos and A. Dongari-Bagtzoglou (2012). "*Candida albicans* biofilms do not trigger reactive oxygen species and evade neutrophil killing." J Infect Dis **206**(12): 1936-1945.
- Yamaguchi, H. (1999). "Molecular and biochemical mechanisms of drug resistance in fungi." Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi **40**(4): 199-208.
- Yodmongkol, S., R. Chantarachindawong, S. Thaweboon, B. Thaweboon, T. Amornsakchai and T. Srikhirin (2014). "The effects of silane-SiO₂ nanocomposite films on *Candida albicans* adhesion and the surface and physical properties of acrylic resin denture base material." J Prosthet Dent **112**(6): 1530-1538.
- Yoon, H. K., S. H. Cho, D. Y. Lee, B. H. Kang, S. H. Lee, D. G. Moon, D. H. Kim, D. C. Nam and S. C. Hwang (2017). "A Review of the Literature on Culture-Negative Periprosthetic Joint Infection: Epidemiology, Diagnosis and Treatment." Knee Surg Relat Res **29**(3): 155-164.
- Yue, H., J. Bing, Q. Zheng, Y. Zhang, T. Hu, H. Du, H. Wang and G. Huang (2018). "Filamentation in *Candida auris*, an emerging fungal pathogen of humans: passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch." Emerg Microbes Infect **7**(1): 188.
- Zeifang, F., M. Grunze, G. Dellling, H. Lorenz, C. Heisel, G. Tosounidis, D. Sabo, H. G. Simank and J. H. Holstein (2008). "Improved osseointegration of PTFEP-coated titanium implants." Med Sci Monit **14**(2): BR35-40.
- Zhao, B., H. C. van der Mei, G. Subbiahdoss, J. de Vries, M. Rustema-Abbing, R. Kuijter, H. J. Busscher and Y. Ren (2014). "Soft tissue integration versus early biofilm formation on different dental implant materials." Dent Mater **30**(7): 716-727.
- Zhou, L., J. Xu, X. Liang and Z. Liu (2010). "Adsorption of platinum(IV) and palladium(II) from aqueous solution by magnetic cross-linking chitosan nanoparticles modified with ethylenediamine." J Hazard Mater **182**(1-3): 518-524.
- Zumbuehl, A., L. Ferreira, D. Kuhn, A. Astashkina, L. Long, Y. Yeo, T. Iaconis, M. Ghannoum, G. R. Fink, R. Langer and D. S. Kohane (2007). "Antifungal hydrogels." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(32): 12994-12998.

9. Anexos

9.1. Anexo I: Programación. Diseño de una macro para el análisis automático de imágenes de microscopía confocal usando el software ImageJ (Fiji).

Para diseñar esta macro se utilizó la herramienta “recorder” presente en el programa, que funciona mostrando al usuario en forma de código todas las acciones que éste realiza. Esto permite visualizar el código, basado en java, de la secuencia de procesos que haya que seguir para analizar una sola imagen, para después extraerlo y crear una iteración que funcione para varias imágenes, o, en este caso, para todas las imágenes contenidas en varias carpetas. El código se guarda como un archivo .ijm, legible por el programa, editable y ejecutable a voluntad del usuario. La optimización de la macro se llevó a cabo consultando foros del programa ImageJ (<https://forum.image.sc/t/welcome-to-the-imagej-forum/8> y <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>), que al ser de código abierto permite que todos los usuarios modifiquen, creen y compartan nuevas funciones.

El código de la macro es el siguiente:

```
run("Close All");
dir = getDirectory("Choose a Directory ");
setBatchMode(true);
count = 0;
countFiles(dir);
n = 0;
processFiles(dir);
//print(count+" files processed");
function countFiles(dir) {
    list = getFileList(dir);
    for (i=0; i<list.length; i++) {
        if (endsWith(list[i], "/"))
            countFiles(""+dir+list[i]);
        else
            count++;
    }
}
function processFiles(dir) {
    list = getFileList(dir);
    for (i=0; i<list.length; i++) {
        if (endsWith(list[i], "/"))
            processFiles(""+dir+list[i]);
        else {
            showProgress(n++, count);
            path = dir+list[i];
            processFile(path);
        }
    }
}
```

```

    }
    }
}

function processFile(path) {
    if (endsWith(path, ".tif"))
    {
        open(path);
        run("8-bit");
        setAutoThreshold("Default dark");
        makeRectangle(0, 440, 440, 440);
        run("Analyze Particles...", "show=Nothing display summarize clear");
        makeRectangle (440, 0, 440, 440);
        run("Analyze Particles...", "show=Nothing display summarize clear");
        run("Close All");
    }
}

selectWindow("Results");
run("Close");
selectWindow("Summary");
saveAs("results");
setBatchMode(false);

```

La macro funciona pidiendo al usuario que seleccione la carpeta donde están las imágenes a analizar (incluyendo las que están contenidas en subcarpetas), y una vez seleccionada, busca todas las imágenes que sean de formato “.TIFF” (aunque es extensible a muchos otros formatos) y sobre cada una de ellas realiza el proceso resaltado en color verde en el código. Por cada imagen de microscopia confocal tomada, cuantifica las partículas que tienen fluorescencia roja (correspondiente a células metabólicamente activas) y verde (correspondiente a células metabólicamente inactivas, componentes de paredes celulares y la matriz extracelular). Los resultados que recogen el número de partículas, el tamaño de éstas y el porcentaje de superficie cubierta se guardan en la carpeta que elija el usuario en formato de valores separados por comas (“.csv”), importable por el programa Excel. Además, la macro está diseñada para poder editar fácilmente el procesamiento de las imágenes cambiando el código resaltado en verde por otro que se quiera hacer.

Esta macro permite ahorrar mucho tiempo de análisis (es capaz de analizar unas 100 imágenes por minuto gracias al procesamiento en batch) y elimina la variabilidad introducida por un usuario al realizar el análisis de forma manual, lo que incrementa el error de las medidas en muestras grandes de imágenes.

9.2. Anexo II: Publicaciones y comunicaciones en congresos relacionadas con la tesis

Publicaciones

1. *Candida auris*: a comparison between planktonic and biofilm susceptibility to antifungal drugs. **David Romera**, John Jairo Aguilera-Correa, Ignacio Gadea, Lourdes Viñuela-Sandoval, Julio García-Rodríguez, Jaime Esteban. *Journal of Medical Microbiology*. 2019. 68(9):1353-1358.
2. Aggregative and non-aggregative strains of *Candida auris* trigger different responses in *Galleria mellonella* infection model. **David Romera**, John-Jairo Aguilera-Correa, Marta García Coca, Ignacio Mahillo-Fernández, Jaime Esteban. Submitted.
3. Treatment of *C. auris* biofilms with current antifungals affects to its structure and viability. **David Romera**, John Jairo Aguilera-Correa, María del Mar González-Parreño, Jaime Esteban. En preparación.
4. A novel antifungal-loaded sol-gel coating for the prevention and local treatment of fungal prosthetic joint infections. **David Romera**, Amaya García-Casas, Beatriz Toirac, John Jairo Aguilera-Correa, Francisco Miguel Conesa-Buendía, Aránzazu Mediero, Antonia Jiménez-Morales, Jaime Esteban. Submitted.
5. Chapter: Mechanisms of biofilm formation in clinically used biomaterials. In *Microbial Biofilms: Current Research and Practical Implications*. John Jairo Aguilera-Correa, Jaime Esteban, **David Romera**. 2020. Caister Academic Press.

Otras publicaciones relacionadas

1. Sol–Gel-Deposited Ti-Doped ZnO: Toward Cell Fouling Transparent Conductive Oxides. Rehab Ramadan, **David Romera**, Rosalía Delgado Carrascón, Miguel Cantero, John Jairo Aguilera-Correa, Josefa P García-Ruiz, Jaime Esteban, Miguel Manso-Silván. ACS Omega, 2019. 4(7):11354-11363.
2. Fluor-carbonated hydroxyapatite coatings by pulsed laser deposition to promote cell viability and antibacterial properties. Bettiana M. Hidalgo-Robatto, John Jairo Aguilera-Correa, Miriam López-Álvarez, **David Romera**, Jaime Esteban, Pío González, Julia Serra. Surface and Coatings Technology. 2018. 349:736-744.
3. Non-Tuberculous Mycobacteria multispecies biofilms in cystic fibrosis: development of an *in vitro* *Mycobacterium abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa* dual species biofilm model. Graciela Rodríguez-Sevilla, Marta García-Coca, **David Romera**, John Jairo Aguilera-Correa, Ignacio Mahillo-Fernández, Jaime Esteban, Concepción Pérez-Jorge. International Journal of Medical Microbiology. 2018. 308(3):413-423.
4. Non-pigmented rapidly growing mycobacteria smooth and rough colony phenotypes pathogenicity evaluated using *in vitro* and experimental models. Marta García-Coca, John-Jairo Aguilera-Correa, Arancha Ibáñez-Apesteguía, Graciela Rodríguez-Sevilla, **David Romera**, Ignacio Mahillo-Fernández, Gabriel Reina, Mirian Fernández-Alonso, José Leiva, María-Carmen Muñoz-Egea, José Luis Del Pozo, Jaime Esteban. Pathogens and Disease. 2019.
5. A new antibiotic-loaded sol-gel can prevent bacterial prosthetic joint infection: from *in vitro* studies to a in vivo model. John Jairo Aguilera-Correa, Amaya Garcia-Casas, Aranzazu Mediero, **David Romera**, Francisca Mulero, Irene Cuevas-López, Antonia Jiménez-Morales, Jaime Esteban. Submitted.

Comunicaciones a congresos Internacionales

1. Antifungal loaded organo-inorganic sol-gel coating decreases *Candida albicans* biofilm formation. **David Romera**, John Jairo Aguilera-Correa, Amaya Garcia-Casas, Antonia Jimenez-Morales, Jaime Esteban-Moreno. **Poster** at 29th European congress of clinical microbiology and infectious diseases ECCMID 2019.
2. Reduction of adherence of strictly anaerobic bacteria on fluorine-doped titanium. **David Romera**, Ana Conde, María-Ángeles Arenas, Juan-José de Damborenea, Jaime Esteban, John-Jairo Aguilera-Correa. **Oral communication** at European Orthopaedic Research Society congress EORS 2017.
3. Staphylococcal adherence decreases on fluorohydroxyapatite coatings. **David Romera**, Bettiana M Hidalgo-Robatto, Pío González, Julia Serra, Jaime Esteban, John-Jairo Aguilera-Correa. **Oral communication** at EORS 2017.
4. Eradication of bacterial biofilm treated with moxifloxacin-loaded hybrid organo-inorganic sol-gel coating. John Jairo Aguilera-Correa, Amaya Garcia-Casas, **David Romera**, Antonia Jimenez-Morales, Jaime Esteban. **Oral communication** at 28th European congress of clinical microbiology and infectious diseases ECCMID 2018.
5. Urine aluminium concentration as possible implant biomarker when a Ti-6Al-4V implant is infected by *Pseudomonas aeruginosa*: an *in vivo* rabbit model. John Jairo Aguilera-Correa, Álvaro Auñón-Rubio, Ignacio Mahillo-Fernandez, **David Romera**, Diego Eguibar-Blazquez, Ana Conde, María Ángeles Arenas, Juan José de Damborenea, Marin M, Jaime Esteban. **Oral communication** at ECCMID 2018.

6. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for studying the virulence of *Mycobacterium abscessus*. Marta García-Coca, John Jairo Aguilera-Correa, **David Romera**, Jaime Esteban. **Poster** at ECCMID 2018.
7. F-P-TiO₂ bottle-shaped nanotubular loaded with gentamicin and vancomycin mixture as prevention of prosthetic joint infection caused by *S. aureus*: an *in vivo* rabbit model. Álvaro Auñón-Rubio, Ignacio Mahillo-Fernandez, **David Romera**, Diego Eguibar-Blázquez, Ana Conde, Maía Ángles Arenas, Juan José de Damborenea, Marin M, Jaime Esteban, John Jairo Aguilera-Correa. **Oral communication** at ECCMID 2018.

Comunicaciones a congresos nacionales

1. Membranas de polieterimida cargadas con Irgasán disminuyen la adherencia de especies relacionadas con neumonía asociada a ventilación mecánica. **David Romera**, Virginia López Gómez Carreño, John Jairo Aguilera Correa, Maria Luz Sánchez Silva, Jose Luis Valverde Palomino, Jaime Esteban. **Póster** en el XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, SEIMC 2019.
2. Prevención y tratamiento de infecciones de prótesis causadas por *C. albicans* mediante un recubrimiento cargado con antifúngicos. **David Romera**, John Jairo Aguilera Correa, Amaya García Casas, Antonia Jiménez Morales, Jaime Esteban. **Póster** en el XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, SEIMC 2019.
3. Comparación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de células planctónicas y biopelículas del patógeno multirresistente *Candida auris*. **Comunicación oral** en el congreso SEIMC 2018.
4. Modelo *in vivo* de infección de *Candida auris* en *Galleria mellonella*. **David Romera**, John Jairo Aguilera Correa, Marta García Coca, Jaime Esteban. **Comunicación oral** en el congreso SEIMC 2018.

5. Caracterización de biomateriales a través de la interacción bacteriana con la superficie del mismo. **David Romera**, John Jairo Aguilera Correa, Miguel Manso Silván, Jaime Esteban. **Póster** en el congreso SEIMC 2018.
6. Concentración de aluminio en orina como posible biomarcador relacionado con implantes de Ti-6Al-4V infectados por *P. aeruginosa*: un modelo de conejo *in vivo*. John Jairo Aguilera Correa, Alvaro Auñón, Ignacio Mahillo Fernández, **David Romera**, Diego Eguibar Blázquez, Ana Conde, María Angeles Arenas, Juan José De Damborenea, Miguel Marín, Jaime Esteban. **Póster** en el congreso SEIMC 2018.
7. Evaluación del modelo de larvas de *Galleria mellonella* para el estudio de la virulencia de *Mycobacterium abscessus*. Marta Garcia Coca, John Jairo Aguilera Correa, **David Romera**, Jaime Esteban. **Póster** en el congreso SEIMC 2018.
8. Utilidad del kit VITEK® MS Mycobacterium/Nocardia (MALDI-ToF) en la identificación de actinomicetales aerobios. Llanos Salar Vidal, John Jairo Aguilera Correa, Alicia Macías Valcayo, Marta García Coca, **David Romera**, Jaime Esteban. **Comunicación oral** en el congreso SEIMC 2018.
9. Erradicación del biofilm bacteriano tratado con un recubrimiento sol-gel orgánico-inorgánico cargado con moxifloxacino. John Jairo Aguilera Correa, Amaya García Casas, **David Romera**, Antonia Jiménez Morales, Jaime Esteban. **Comunicación oral** en el congreso SEIMC 2018.
10. Evaluación de la capacidad formadora de biofilm de bacilos gramnegativos a partir de cepas aisladas de infección de prótesis articular - Alicia Macías Valcayo, Llanos Salar Vidal, John Jairo Aguilera Correa, Patricia Madrazo Clemente, Marta García Coca, **David Romera**, Jaime Esteban. **Póster** en el congreso SEIMC 2018.

11. La monitorización animal periódica permite prever la eficacia del recubrimiento de sol gel organo inorgánico cargado con moxifloxacin en un modelo murino de infección de prótesis articular. John Jairo Aguilera Correa, Amaya García Casas, **David Romera**, Irene Cuevas López, Víctor Faus Rodrigo, Diego Eguibar Blázquez, Antonia Jiménez Morales, Carlos Carnero Guerrero, Carlos Castilla Reparaz, Jaime Esteban. **Póster** en el XV congreso de la Sociedad Española para las ciencias del animal de laboratorio. Sevilla, 2019.

9.3. Anexo III: Becas

Beca predoctoral de investigación Jiménez Díaz de la Fundación Conchita Rábago. Fui beneficiario de esta ayuda que financió mi actividad como investigador predoctoral entre enero de 2017 y noviembre de 2018 en el departamento de microbiología clínica de la Fundación Jiménez Díaz, con Jaime Esteban Moreno como tutor.

Beca de Investigación de la Fundación Mutua Madrileña. Este proyecto, titulado “diseño de recubrimientos biodegradables tipo sol-gel con propiedades antimicrobianas para la prevención y el tratamiento local de infecciones sobre biomateriales de uso clínico” fue concedido por la Fundación Mutua Madrileña por un periodo de tres años, y ha financiado el material fungible utilizado en esta tesis.

Proyecto Aspire (Pfizer). Este programa permitió la adquisición de la anidulafungina.

Candida auris: a comparison between planktonic and biofilm susceptibility to antifungal drugs

David Romera¹, John Jairo Aguilera-Correa¹, Ignacio Gadea¹, Lourdes Viñuela-Sandoval², Julio García-Rodríguez³ and Jaime Esteban^{1,*}

Abstract

Introduction. *Candida auris* is a pathogenic yeast that mainly affects immunosuppressed patients and those with implanted medical devices. This pathogen also displays elevated resistance to common antifungals and high survival and spreading capacities. Since no antifungal breakpoints have yet been defined for this pathogen, the data obtained here can be useful for further research concerning treatment or implementation of a prevention and disinfection protocol. Our aim was to study the antifungal resistance of *C. auris* to current antifungals in planktonic and sessile states. Using confocal laser scanning microscopy and viable biomass production, we demonstrated the ability of *C. auris* to develop a mature biofilm. We compared the minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal biofilm eradication concentration (MBEC) for the *C. auris* DSM 21092 strain plus two clinical isolates, and the results were compared with those obtained for *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*, two species strongly linked to bloodstream infections and infections associated with biomaterials. We found that the clinical isolates of *C. auris* were resistant to fluconazole and sensitive to echinocandins and polyenes. The *C. auris* biofilms did not show susceptibility to any antifungal agent, showing MBECs that were up to 512-fold higher than the MICs. These findings highlight the importance of biofilm formation as a key factor underlying the resistance of this species to antifungals and suggest that the presence of implantable medical devices is one of the major risk factors in immunocompromised patients.

INTRODUCTION

Candida auris is an opportunistic pathogenic yeast that has been attracting attention of late as it has increasingly been isolated as the aetiological agent in nosocomial outbreaks of candidaemia and/or invasive candidiasis in patients hospitalized in intensive care facilities [1, 2]. Since the first identification of the pathogen in Japan in 2009 [3], these outbreaks have been reported throughout the world, with mortality rates ranging from 28 to 72% [1, 4–7]. Infections by *C. auris* have been also associated with the development of pericarditis and urinary and respiratory tract diseases [8, 9]. Immunosuppression is the major risk factor associated with infection by this pathogen and the development of invasive candidiasis [10], and other risk factors, such as the presence of implantable medical devices, the existence of comorbidities, invasive procedures, prolonged stays in intensive care units (ICUs) and previous prophylactic treatment with antifungals, have also been proposed [10, 11]. Importantly, virulence factors, such

as comparable biofilm formation, secreted proteinase activity and phospholipase activity to *Candida albicans*, usually regarded as the most virulent member of the genus, have been identified [12–14]. Additionally, this micro-organism has shown high colonization and survival capacities [15, 16], and has been recovered from the skin of health-care workers and patients, areas that have been in contact with infected patients and a broad variety of surfaces, suggesting that this yeast might have a role in environmental contamination [17]. Moreover, currently used antiseptic and disinfectant agents, such as chlorhexidine, povidone iodine, hydrogen peroxide or ethyl alcohol, have shown variable efficacy against yeasts in both planktonic and sessile states [18, 19]. Consequently, more research is required to implement a safety and disinfection protocol.

One of the major characteristics of this species is its reported variable resistance to most of the antifungals currently

Received 21 June 2019; Accepted 28 June 2019; Published 04 July 2019

Author affiliations: ¹Department of Clinical Microbiology, IIS Fundación Jiménez Díaz, 28040 Madrid, Spain; ²Department of Microbiology, Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid, Spain; ³Department of Microbiology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain.

*Correspondence: Jaime Esteban, jestebanmoreno@gmail.com

Keywords: *Candida auris*; susceptibility; antifungal; biofilm; resistance.

Abbreviations: CLSM, confocal laser scanning microscope; DMSO, dimethyl sulfoxide; EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; ICUs, intensive care units; RPMI, Roswell Park Memorial Institute.

employed to treat infections produced by other relevant *Candida* species, such as *C. albicans* or *Candida parapsilosis* [3, 6, 9, 20, 21], making the existence of strains with a pan-drug resistance phenotype feasible.

Since no antifungal susceptibility breakpoints have been officially established for either planktonic or sessile cells of *C. auris*, the main purposes of this work are to acquire relevant data that could help to establish a susceptibility pattern for *C. auris* for planktonic cells and biofilms, and to remark on the importance of including clinical isolates in this kind of experiments, since they often display different behaviour to collection and reference isolates, as we demonstrate here. In this work we determined and compared the planktonic minimum inhibitory concentration (MIC) with the minimum biofilm eradication concentration (MBEC) for *C. auris*. We tested antifungals currently used in clinical treatment of *C. auris* and the results were compared with those obtained for *C. albicans* and *C. parapsilosis*, the most common species associated with invasive candidiasis [22].

Selection and identification of the strains and antifungals

Experiments were performed using *C. albicans* ATCC 10231 plus three clinical isolates, Cal1 (catheter), Cal2 (catheter) and Cal35 (hip prosthesis); *C. parapsilosis* ATCC 22019 plus three clinical isolates, κ 1 (otitis), κ 2 (knee prosthesis) and κ 4 (hip prosthesis); and *C. auris* DSM 21092 plus two clinical isolates, Cau40 (blood culture) and Cau63 (colonization control). All strains were maintained at 37°C on Sabouraud gentamicin-chloramphenicol plates. The *C. albicans* and *C. parapsilosis* clinical isolates were identified by tandem matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) using a Vitek MS system (BioMérieux). The *C. auris* isolates were identified and provided by National Centre of Microbiology (Institute of Health Carlos III, ISCH, Madrid, Spain).

The antifungals employed to determine the MICs and MBECs were amphotericin B deoxycolate (Sigma-Aldrich), caspofungin, fluconazole, voriconazole (Sigma) and anidulafungin (Pfizer). Stock solutions were prepared using dimethyl sulfoxide (DMSO) as a diluting agent.

MIC determination

The MIC is defined as the lowest concentration of antifungal agent that inhibits fungal growth. In this work, the MICs were determined following the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standardized broth microdilution method for fungal susceptibility testing [23] using Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium supplemented with glucose 2% for diluting the antifungal stock solution 1000-fold. The EUCAST recommendations for final antifungal testing concentrations were followed when performing the experiments (amphotericin B, 0.032–16 mg l⁻¹; anidulafungin, 0.016–8 mg l⁻¹; caspofungin, 0.016–8 mg l⁻¹; fluconazole, 0.12–64 mg l⁻¹; voriconazole, 0.016–8 mg l⁻¹). Fifty per cent inhibition was used for azoles and echinocandins and 90% inhibition was used for polyenes, as suggested in the EUCAST guidelines [23]. The obtained MICs were interpreted using the EUCAST breakpoint tables for the interpretation of MICs (published online [24]). Experiments were performed on three biological replicates. For positive controls, yeast suspensions without added antifungals were used, while fresh RPMI 1640 medium alone was used as a negative control.

The obtained MICs (Table 1) showed that the *C. albicans* strains were sensitive to amphotericin B (MIC <1 mg l⁻¹), anidulafungin (MIC <0.032 mg l⁻¹), fluconazole (MIC <2 mg l⁻¹) and voriconazole (MIC <0.063 mg l⁻¹), with the exception of the strain *C. albicans* ATCC, which was intermediately resistant to voriconazole (0.063 ≤ MIC ≤ 0.125 mg l⁻¹). The clinical strain Cal 2 was sensitive to caspofungin (MIC <0.032 mg l⁻¹), whereas the strains *C. albicans* ATCC, Cal 1 and Cal 35 were resistant to it (MIC >0.032 mg l⁻¹). All *C. parapsilosis* strains were sensitive to amphotericin B (MIC <1 mg l⁻¹) and fluconazole (MIC <2 mg l⁻¹), while being intermediately resistant to anidulafungin and caspofungin (0.002 ≤ MIC ≤ 4 mg l⁻¹). Strains ATCC 22019 and κ 4 were sensitive to voriconazole (MIC <0.125 mg l⁻¹) and isolates κ 1 and κ 2 were intermediately resistant to it (0.125 ≤ MIC ≤ 0.25 mg l⁻¹).

Amphotericin B, echinocandins and voriconazole were effective against all *C. auris* strains, whilst fluconazole showed reduced activity against *C. auris* DSM 21092 (MIC >4 mg l⁻¹) and was ineffective against the clinical isolates Cau 40 and

Table 1. Planktonic minimum inhibitory concentration values obtained for each isolate. Values are cited in mg l⁻¹. Experiments were performed on three biological replicates

Minimum inhibitory concentration (MIC)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Cal 1	Cal 2	Cal 35	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	κ 1	κ 2	κ 4	<i>C. auris</i> DSM 21092	Cau 40	Cau 63
Amphotericin B	0.5	0.063	0.5	0.25	0.5	0.25	0.063	0.063	0.5	0.5	1
Anidulafungin	0.032	0.016	0.016	0.016	0.125	0.25	1	2	0.125	0.25	0.125
Caspofungin	0.5	0.063	0.016	0.063	2	4	4	2	0.25	0.5	0.25
Fluconazole	0.125	<0.125	<0.125	<0.125	0.25	0.25	1	0.5	4	16	64
Voriconazole	0.125	0.063	0.032	0.063	0.063	0.25	0.5	0.125	0.5	0.5	0.5

Cau 63 (MIC=16 and 64 mg l⁻¹, respectively). The MICs obtained are consistent with other published MICs determined following EUCAST guidelines [25]. Interestingly, the MIC values for fluconazole against *C. auris* isolates were considerably higher than those obtained for *C. albicans* and *C. parapsilosis* strains (MIC<2 mg l⁻¹), which is in agreement with the proposed intrinsic resistance to fluconazole displayed by *C. auris* [3]. In fact, due to the resistance to azoles and amphotericin B reported for the first *C. auris* isolates, echinocandins were recommended for empirical treatment for candidaemia and invasive candidiasis caused by *C. auris* [26–28]. Nevertheless, strains that are resistant to echinocandins have been described in either planktonic or sessile states [21, 29]. Recently, genetic analysis has reported the presence of genes encoding proteins involved in the acquisition of resistance, such as efflux pumps, protein kinases and major facilitator superfamilies (MFS) [30, 31], and mutations in genes related to the development of triazole resistance have also been reported [6]. These features would contribute substantially to the antifungal resistance of this pathogen.

Determination of biofilm formation in *C. auris*

To demonstrate biofilm production by *C. auris*, the reference strain *C. auris* DSM 21092 was employed. Biofilm formation was induced by inoculating 300 µl of a solution containing 0.5 McFarland [$0.5\text{--}2.5 \times 10^5$ colony-forming units (c.f.u.) ml⁻¹] on a µ-slide eight-well uncoated microscopy chamber (Ibidi), using RPMI 1640 medium supplemented with glucose 2%. Yeasts were incubated at 80 r.p.m. for 48 h at 37°C, and then the medium was removed and biofilms were stained with 50 µl from the LIVE/DEAD yeast viability kit (Thermo Fisher Scientific) for 30 min. The staining was washed with sterile water and biofilms were imaged on a Leica SP5 confocal laser scanning microscope (CLSM) (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) using a 1000× magnification.

The CLSM image showed that the biofilms produced by *C. auris* mainly comprised densely packed groups of round/oval cells with no presence of hyphae or pseudo-hyphae and little or no production of extracellular matrix (ECM) (Fig. 1). This is similar to other non-*albicans* species such as *Candida glabrata* [21]. Other related species, such as *C. parapsilosis* or *Candida haemulonii*, also produce a biofilm consisting of densely packed blastospores in the first hours, but it culminates with the production of pseudo-hyphae in the next 24 h [32, 33].

Determination of viable biomass production

In all strains, biofilm formation was induced by seeding *C. albicans* and *C. auris* colonies from 24 h and *C. parapsilosis* colonies from 48 h Sabouraud gentamicin-chloramphenicol plates at a concentration of 0.5 McFarland ($0.5\text{--}2.5 \times 10^5$ c.f.u. ml⁻¹) in RPMI 1640 medium supplemented with 2% glucose on untreated flat-bottomed 96-well Fluoronunc Black polystyrene microtitre plates (Microwell, Thermo Scientific). One hundred microlitres of the yeast suspension was incubated for 48 h at 37°C and 5% CO₂. Viable biomass production was determined by adding 10 µl of Alamar Blue to each well

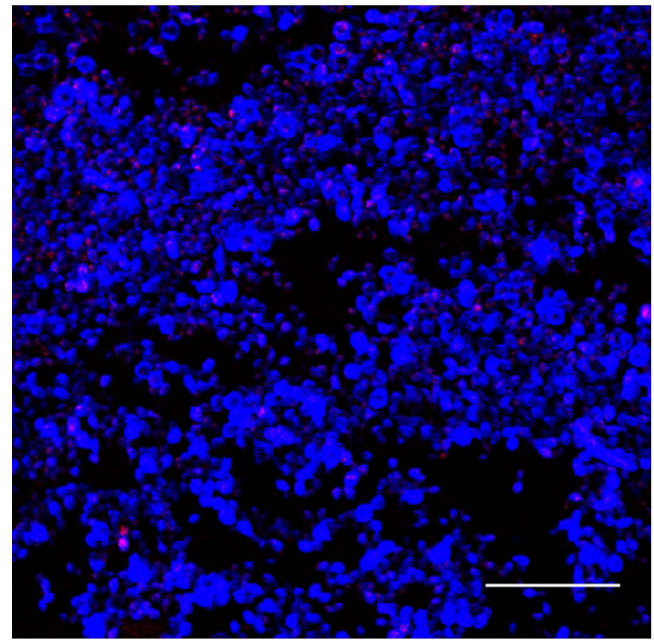


Fig. 1. *C. auris* biofilm. Imaging of *C. auris* DSM 21092 biofilm grown for 48 h and stained using the LIVE/DEAD yeast viability kit. The yeast cell walls are represented in blue, and metabolically active yeasts displaying compact intravacuolar structures are stained in red. The remaining space that conforms the water channel is represented in black. Scale bars represent 40 µm (1000× original magnification).

followed by incubation at 80 r.p.m. for 3 h at 37°C. Fluorescence was measured in a Perkin Elmer EnSpire Multimode Reader using an excitation wavelength of 570 nm and an emission wavelength of 585 nm. Experiments were performed on three biological replicates using fresh RPMI 1640 medium alone as a negative control.

Statistical analysis for comparison of the values of viable biomass production was performed by pairwise comparisons using the Mann–Whitney test with a level of statistical significance of $P < 0.05$ using StataCorp software (Stata Software).

The values for viable biomass production (Fig. 2) showed that clinical isolates of *C. albicans* produced the highest levels of viable biomass, which is a consequence of the accumulation of hyphae and high quantities of ECM [34]. Interestingly, the clinical isolate Cau 63 produced a similar level of viable biomass to *C. albicans* ATCC 10231 ($P=0.1722$), clinical isolate Cal 35 ($P=0.0929$) and *C. parapsilosis* clinical isolate κ1 ($P=0.5286$), whereas *C. auris* DSM 21092 and the clinical isolate Cau 40 produced the lowest level ($P=0.0008$ and 0.0016 , respectively). This result is in agreement with other published findings reporting that the biofilm formation of non-*albicans* clinical strains often displays variability in comparison with reference strains [35, 36].

Additionally, *C. parapsilosis* biofilms produce pseudo-hyphae and minimal quantities of ECM with high amounts of clumped blastospores, which would explain the lower level of viable biomass production observed [37].

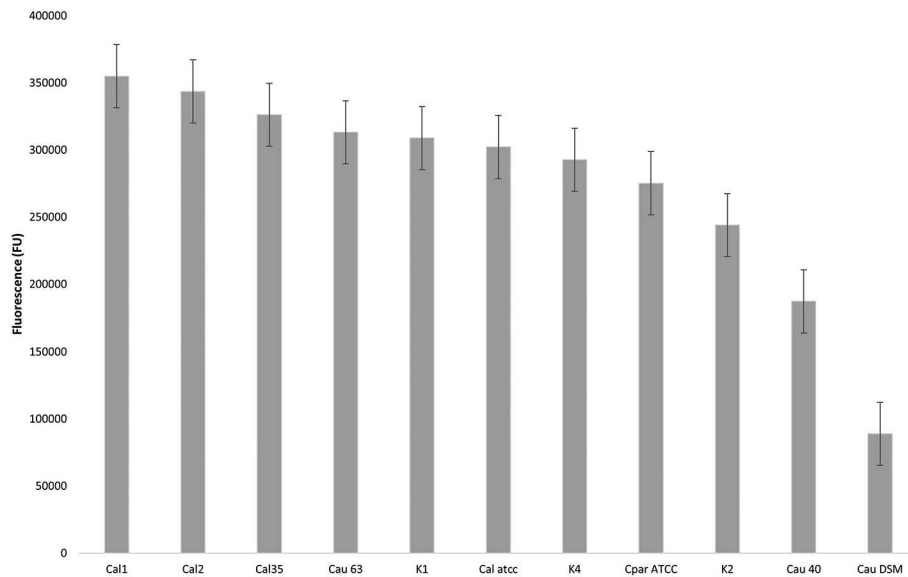


Fig. 2. Viable biomass production. Biomass production of 48 h biofilms stained with Alamar Blue. Data represent the median with interquartile error of experiments performed on three biological replicates.

MBEC determination

The MBEC can be defined as the lowest concentration of antimicrobial agent that eradicates a grown biofilm. Biofilms were produced following the same methodology as was used for measuring the production of viable biomass, and MBECs were determined using a modified version of a previously published methodology [38]. Briefly, medium from biofilms grown for 48 h was aspirated using a vacuum pump and 100 µl of antifungal dilutions prepared separately were added to the biofilms and incubated for 48 h at 37°C and 5% CO₂. After this, 10 µl of Alamar Blue was added to each well and incubated with gentle shaking at 80 r.p.m. for 3 h at 37°C, and fluorescence was measured with an excitation wavelength of 570 nm and an emission wavelength of 585 nm. The range of final antifungal concentrations tested was 0.032–256 mg l⁻¹ for all antifungals. Fifty % eradication was used for azoles and echinocandins and 90% eradication was used for polyenes in order to establish a comparison with the MICs. Experiments were performed on three biological replicates using yeast

suspensions without added antifungals as positive controls, while fresh RPMI 1640 medium alone was used for negative controls.

Here, we found that globally the MBECs (Table 2) were significantly higher than the MICs. Compared to the MIC values, the biofilms produced by all *C. albicans* isolates displayed high MBEC values against azoles (2000–8000-fold) and echinocandins (250–2000-fold), maintaining relative susceptibility to amphotericin B (2–8-fold), with the exception of the biofilm produced by the clinical isolate Cal 35 (32-fold), which was found to be resistant against all antifungals. The biofilms produced by the *C. parapsilosis* strains displayed elevated MBECs for azoles (8–2000-fold) and echinocandins (16–256-fold). The strains *C. parapsilosis* ATCC 22019 and κ1 remained susceptible to amphotericin B (0.25–0.5 mg l⁻¹). The strains κ2 and κ4 showed an MBEC that was elevated fourfold in comparison to the MIC.

Table 2. Minimum biofilm eradication concentration values obtained for each isolate. Values are given in mg l⁻¹. Experiments were performed on three biological replicates

Minimum biofilm eradication concentration (MBEC)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Cal 1	Cal 2	Cal 35	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	κ1	κ2	K4	<i>C. auris</i> DSM 21092	Cau 40	Cau 63
Amphotericin B	1	0.5	1	8	0.5	0.25	0.25	0.25	>128	>256	>256
Anidulafungin	8	32	32	32	32	32	32	32	8	64	64
Caspofungin	32	64	32	64	32	64	64	128	64	64	64
Fluconazole	>256	>256	>256	>256	>256	>256	128	4	>256	>256	256
Voriconazole	>256	>256	>256	>256	128	>256	128	4	>256	>256	>256

Importantly, none of the biofilms produced by the *C. auris* strains showed susceptibility to any tested antifungal agent, with MBECs that were up to 250-fold higher than the planktonic MICs for amphotericin B, 64–512-fold higher than the planktonic MICs for echinocandins and 4–512-fold higher than the planktonic MICs for azoles. Anidulafungin was the only antifungal agent that showed activity against the *C. auris* strain DSM 21092 (MBEC=8 mg l⁻¹).

This is in agreement with numerous works in which it has been demonstrated that biofilm formation in *Candida* species is responsible for enhanced resistance to antimicrobials [39]. Moreover, it is well established that in biofilms produced by *C. albicans* and *C. parapsilosis* the properties of the ECM, hyphal/pseudo-hyphal growth, yeast accumulation and/or genetic adaptations contribute to antifungal resistance [40, 41]. This seems not to be the case for biofilms produced by *C. auris*, since they present very low production of ECM and hyphal/pseudo-hyphal growth.

Hence, the main mechanisms underlying resistance to antifungals might be similar to those described for *C. glabrata*, namely high cell density and genetic plasticity [42].

These results highlight the importance of biofilm characterization of *C. auris*, as it is a determinant pathogenic factor for the development of bloodstream infections in immunosuppressed patients and/or those with implanted medical devices. In fact, the presence of medical devices and biomaterials, such as denture prostheses, urinary catheters and prosthetic joints, is considered to be a key risk factor when considering infections caused by *Candida* species, as they provide a surface and support for biofilm development [43], playing an important role in the development of candidaemia and/or invasive candidiasis [44–46]. Moreover, the resistance to antifungal agents displayed by *C. auris* biofilms will contribute to its virulence, transmission and survival in hospital facilities, increasing the chance of it spreading and producing new outbreaks. Taken together, these findings indicate that the implementation of specific infection prevention and control (IPC) guidance that combines antifungal stewardship and prevention/disinfection measures is necessary.

Funding information

This work is funded by Mutua Madrileña Foundation. D. R. is funded by a PhD grant from Fundación Conchita Rábago, Madrid. Anidulafungin was obtained through the ASPIRE Program, Pfizer.

Author contributions

D. R.: conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, visualization, writing of the original draft, review and editing; J. J. A. -C.: conceptualization, methodology, resources, supervision, validation; I. G.: supervision, writing of the original draft, review and editing; L. V. -S.: resources, validation; J. G. -R.: resources, validation; J. E.: conceptualization, funding acquisition, project administration, resources, supervision, validation, visualization, writing of the original draft, review and editing.

Conflicts of interest

J. E. received travel fees from Pfizer.

References

- Calvo B, Melo AS, Perozo-Mena A, Hernandez M, Francisco EC et al. First report of *Candida auris* in America: clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. *J Infect* 2016;73:369–374.
- Ruiz Gaitán AC, Moret A, López Hontangas JL, Molina JM, Aleixandre López AI et al. Nosocomial fungemia by *Candida auris*: first four reported cases in continental Europe. *Rev Iberoam Micol* 2017;34:23–27.
- Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K et al. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol* 2009;53:41–44.
- Chowdhary A, Sharma C, Duggal S, Agarwal K, Prakash A et al. New clonal strain of *Candida auris*, Delhi, India. *Emerg Infect Dis* 2013;19:1670–1673.
- Magobo RE, Corcoran C, Seetharam S, Govender NP. *Candida auris* –associated Candidemia, South Africa. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1250–1251.
- Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 Continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis* 2017;64:134–140.
- Wang X, Bing J, Zheng Q, Zhang F, Liu J et al. The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects. *Emerg Microbes Infect* 2018;7:1–9.
- Morales-López SE, Parra-Giraldo CM, Ceballos-Garzón A, Martínez HP, Rodríguez GJ et al. Invasive infections with multidrug-resistant *Candida auris*, Colombia. *Emerg Infect Dis* 2017;23:162–164.
- Chowdhary A, Voss A, Meis JF. Multidrug-resistant *Candida auris*: 'new kid on the block' in hospital-associated infections? *J Hosp Infect* 2016;94:209–212.
- Rudramurthy SM, Chakrabarti A, Paul RA, Sood P, Kaur H et al. *Candida auris* candidaemia in Indian ICUs: analysis of risk factors. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:1794–1801.
- Jeffery-Smith A, Taori SK, Schelenz S, Jeffery K, Johnson EM et al. *Candida auris*: a review of the literature. *Clin Microbiol Rev* 2018;31 [Epub ahead of print 15 11 2017].
- Larkin E, Hager C, Chandra J, Mukherjee PK, Retuerto M et al. The emerging pathogen *Candida auris*: growth phenotype, virulence factors, activity of antifungals, and effect of SCY-078, a novel glucan synthesis inhibitor, on growth morphology and biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61 [Epub ahead of print 24 04 2017].
- Borman AM, Szekely A, Johnson EM. Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species. *mSphere* 2016;1.
- Fakhim H, Vaezi A, Dannaoui E, Chowdhary A, Nasiry D et al. Comparative virulence of *Candida auris* with *Candida haemulonii*, *Candida glabrata* and *Candida albicans* in a murine model. *Mycoses* 2018;61:377–.
- McCarthy M. Hospital transmitted *Candida auris* infections confirmed in the US. *BMJ* 2016;355:i5978.
- Piedrahita CT, Cadnum JL, Jencson AL, Shaikh AA, Ghannoum MA et al. Environmental Surfaces in Healthcare Facilities are a Potential Source for Transmission of *Candida auris* and Other *Candida* Species. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2017;38:1107–1109.
- Welsh RM, Bentz ML, Shams A, Houston H, Lyons A et al. Survival, persistence, and isolation of the emerging multidrug-resistant pathogenic yeast *Candida auris* on a plastic health care surface. *J Clin Microbiol* 2017;55:2996–3005.
- Abdolrasouli A, Armstrong-James D, Ryan L, Schelenz S. In vitro efficacy of disinfectants utilised for skin decolonisation and environmental decontamination during a hospital outbreak with *Candida auris*. *Mycoses* 2017;60:758–763.
- Cadnum JL, Shaikh AA, Piedrahita CT, Sankar T, Jencson AL et al. Effectiveness of disinfectants against *Candida auris* and other *Candida* species. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2017;38:1240–1243.

20. Chowdhary A, Prakash A, Sharma C, Kordalewska M, Kumar A et al. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009–17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:891–899.
21. Sherry L, Ramage G, Kean R, Borman A, Johnson EM et al. Biofilm-Forming Capability of Highly Virulent, Multidrug-Resistant *Candida auris*. *Emerg Infect Dis* 2017;23:328–331.
22. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag* 2014;10:95–105.
23. Arendrup MC, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2017;9:1–8.
24. (EUCAST) ECOAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs of antifungal agents. version 9.0 2018.
25. Arendrup MC, Prakash A, Meletiadiis J, Sharma C, Chowdhary A. Comparison of EUCAST and CLSI reference microdilution MICs of eight antifungal compounds for *Candida auris* and associated tentative epidemiological cutoff values. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61.
26. Cornely OA, Cuenca-Estrella M, Meis JF, Ullmann AJ. European Society of clinical microbiology and infectious diseases (ESCMID) fungal infection Study Group (EFISG) and European Confederation of medical mycology (ECMM) 2013 joint guidelines on diagnosis and management of rare and emerging fungal diseases. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:1–4.
27. Tragiannidis A, Tsoulas C, Groll AH. Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: update on current guidelines. *Mycoses* 2015;58:10–21.
28. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA et al. Executive summary: clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2016;62:409–417.
29. Vallabhaneni S, Kallen A, Tsay S, Chow N, Welsh R et al. Investigation of the first seven reported cases of *Candida auris*, a globally emerging invasive, multidrug-resistant fungus — United States, May 2013–August 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65:1234–1237.
30. Chatterjee S, Alampalli SV, Nageshan RK, Chettiar ST, Joshi S et al. Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*. *BMC Genomics* 2015;16:686.
31. Sharma C, Kumar N, Pandey R, Meis JF, Chowdhary A. Whole genome sequencing of emerging multidrug resistant *Candida auris* isolates in India demonstrates low genetic variation. *New Microbes and New Infections* 2016;13:77–82.
32. Kean R, Delaney C, Rajendran R, Sherry L, Metcalfe R et al. Gaining insights from *Candida* biofilm heterogeneity: one size does not fit all. *J Fungi* 2018;4:12.
33. Rodrigues CF, Henriques M. Liposomal and deoxycholate amphotericin B formulations: effectiveness against biofilm infections of *Candida* spp. *Pathogens* 2017;6:62.
34. Lewis RE, Lo HJ, Raad II, Kontoyiannis DP. Lack of catheter infection by the *efg1/efg1 cph1/cph1* double-null mutant, a *Candida albicans* strain that is defective in filamentous growth. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1153–1155.
35. Alnuaimi AD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, McCullough MJ. Clinical isolates and laboratory reference *Candida* species and strains have varying abilities to form biofilms. *FEMS Yeast Res* 2013;13:689–699.
36. Monroy-Pérez E, Paniagua-Contreras GL, Rodríguez-Purata P, Vaca-Paniagua F, Vázquez-Villaseñor M et al. High virulence and antifungal resistance in clinical strains of *Candida albicans*. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2016;2016:5930489:1–7.
37. Lattif AA, Mukherjee PK, Chandra J, Swindell K, Lockhart SR et al. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *Int J Med Microbiol* 2010;300:265–270.
38. Repp KK, Menor SA, Pettit RK. Microplate Alamar blue assay for susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Medical Mycology* 2007;45:603–607.
39. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol* 2012;2012:528521–.
40. Nett JE, Crawford K, Marchillo K, Andes DR. Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:3505–3508.
41. Kuhn DM, Mukherjee PK, Clark TA, Pujol C, Chandra J et al. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1074–1081.
42. Rodrigues CF, Silva S, Henriques M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:673–688.
43. Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 2006;6:979–986.
44. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001;183:5385–5394.
45. Rajendran R, Sherry L, Nile CJ, Sherriff A, Johnson EM et al. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012–2013. *Clin Microbiol Infect* 2016;22:87–93.
46. Li WS, Chen YC, Kuo SF, Chen FJ, Lee CH. The impact of biofilm formation on the persistence of candidemia. *Front Microbiol* 2018;9:1196.

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.



Fluor-carbonated hydroxyapatite coatings by pulsed laser deposition to promote cell viability and antibacterial properties

Bettiana Marcela Hidalgo-Robatto^a, John Jairo Aguilera-Correa^b, Miriam López-Álvarez^{a,*}, David Romera^b, Jaime Esteban^b, Pío González^a, Julia Serra^a

^a New Materials Group, Department of Applied Physics, University of Vigo, IISGS, MTI, Campus Lagoas-Marcosende, 36310 Vigo, Spain

^b Department of Clinical Microbiology, IIS Jiménez Díaz Foundation, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Fluor-hydroxyapatite coatings
Marine bioceramics
Pulsed laser deposition
Antibacterial properties
ALP synthesis

ABSTRACT

Fluorine, an essential element present in bone and dental tissues, promotes mineralization and is directly involved in the bone formation process. The antibacterial effects of fluorine on oral bacteria are also well known. In this study, metallic implants were coated with a thin layer of calcium phosphate enriched with fluorine to improve osteointegration and protect against infections. These coatings were obtained by pulsed laser deposition (PLD) using, as a target, a bioceramic of marine origin, mainly composed of fluorapatite from the enameloid of shark teeth. The compositional dependence of coatings on H₂O vapor pressures applied during PLD was analyzed in order to optimize physicochemical properties. Physicochemical characterization to evaluate morphology (SEM), thickness (interferometric profilometry), structure (XRD) and composition (FTIR, XPS) was performed. To evaluate the biological response, both MC3T3-E1 pre-osteoblasts and bacterial strains *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, most responsible for 77% of infections associated with prosthetic implants, were tested. Proper cell proliferation (MTT assay) and ALP synthesis up to 21 days were confirmed. Antibacterial properties were also demonstrated: compared to synthetic hydroxyapatite coatings, there was a significant reduction in colony-forming units (CFUs) for both strains.

1. Introduction

Fluorine (F) is an essential element present in bone and dental tissues. It is thought to be an enhancer of the synthesis of bone cell growth factors, acting primarily on the osteoprogenitor cells and/or undifferentiated osteoblasts cells rather than on highly differentiated osteoblasts. It is therefore related to the promotion of mineralization and is directly involved in the bone formation process [1]. Fluorine contributes to bone healing and regeneration by inducing the differentiation of osteoprogenitor and undifferentiated precursor cells into osteoblasts [2]. Moreover, in the form of fluorapatite, it contributes to the development of a highly crystalline and stable apatite [3], with improved mechanical properties in relation to geological hydroxyapatite, with good stiffness, high elastic modulus and hardness.

The antibacterial effects of fluorine in the form of fluoride on oral bacteria are also well known [4]. There is evidence that fluoride can interfere with enzyme activity and reduce acid production by oral bacteria (both Gram-positive and Gram-negative), thereby inhibiting the enrichment of cariogenic species within dental plaque [5, 6]. The

capacity of fluorine (released from a cement) to inhibit the metabolism of certain bacteria (i.e., oral streptococci) has previously been reported [7]. Studies suggest that fluoride also has anti-plaque properties. It is well documented that amine fluoride and stannous fluoride possess bactericidal properties against oral bacteria [8, 9]. The pre-incubation of hydroxyapatite with amine fluoride significantly decreases the viability of *Streptococcus sobrinus* in biofilm, whereas sodium fluoride or chlorhexidine does not [10].

Joint prostheses are one of the most important medical advances made to date due to their ability to relieve joint pain, restore joint function, and allow millions of patients around the world to recover their independence [11]. However, these prostheses are liable to failure, the main causes being aseptic loosening, infection, dislocation, and fracture of the prosthesis or bone [12]. Aseptic loosening in particular can occur through loss of fixation caused by a lack of initial tissue-implant fixation, leading to a mechanical loss over time and/or particle-induced osteolysis around the implant [13]. Therefore, if osteointegration were promoted, aseptic loosening could be prevented [14].

* Corresponding author.

E-mail addresses: bhidalgo@uvigo.es (B.M. Hidalgo-Robatto), john.aguilera@fjd.es (J.J. Aguilera-Correa), miriammsd@uvigo.es (M. López-Álvarez), david.romerag@quironsalud.es (D. Romera), jaime.esteban@uam.es (J. Esteban), pglez@uvigo.es (P. González), jserra@uvigo.es (J. Serra).

<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.06.047>

Received 30 April 2018; Received in revised form 12 June 2018; Accepted 22 June 2018

Available online 27 June 2018

0257-8972/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Osteointegration can be promoted by covering prostheses with a calcium phosphate layer, mimicking the inorganic composition of bone [14]. Applying such a layer to the surface of titanium implant devices has been proven to enhance bone formation around the implants and contribute to cementless fixation, improving clinical success at an early stage after implantation [15]. Plasma-spray was the first technique used to produce calcium phosphate coatings on dental root implants and hip and knee orthopedic prostheses. However, the high thickness of the coatings (50–200 μm , limitation of the technique) resulted in their partial disappearance during the implantation time, causing the proliferation of macrophages. The pulsed laser deposition (PLD) technique, on the other hand, produces thin coatings with good adhesion properties; it also allows the precise control of the chemistry and crystallinity of the coatings [16, 17]. Synthetic carbonated hydroxyapatite (HA) coatings produced by PLD have been successfully tested, showing enhanced or similar osteointegration to their plasma-sprayed equivalents, but with improved adhesion properties, without the risk of delamination or detachment of the coating [18–25].

Prosthetic joint infection occurs infrequently (1–2% of all cases), though it is a devastating complication with high morbidity and substantial costs. The economic burden of prosthetic joint infection is expected to grow in the coming years due to the increase in patients undergoing arthroplasty replacements [26]. Gram-positive cocci, the most common of which are *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, represent up to 77% of all infections [27–31].

Apart from the administration of oral or intravenous antibiotics to prevent bacterial colonization, the local action of different chemical elements incorporated in trace concentrations into the calcium phosphate structure has been investigated. HA coatings doped with Se, Ag, Cu or Zn have been proven to reduce bacterial biofilm formation due to the chemical changes they promote in the cellular environment [18, 20–23, 32].

Given the interesting properties of fluorine, this paper will describe the use of PLD to coat metallic implants with a thin layer of bioceramic of marine origin, mainly composed of fluorapatite obtained from the enameloid of shark teeth. It will evaluate the structure and composition of different coatings obtained at various H_2O vapor pressures. The vapor pressure exercise examines the dependence of the coatings on pressure, to guarantee optimal properties and good transference from the original bioceramic. Finally, the proliferation and alkaline phosphatase (ALP) synthesis of MC3T3-E1 pre-osteoblasts on the fluor-carbonated HA coatings, together with their antibacterial properties against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains, will be discussed.

2. Materials and methods

2.1. Coating process

Following the same methodology as previous studies [33–36], the fluor-carbonated HA coatings were processed using a UV ArF* excimer laser ($\lambda = 193 \text{ nm}$) source (Lambda Physik COMPEX 205). PLD targets with a mass of 2 g and a diameter of 20 mm were prepared using a bioceramic, developed in our laboratories, obtained from the enameloid of shark teeth (*Isurus oxyrinchus* and *Prionace glauca* species) [37, 38]. The bioceramic granulate was compacted by raising the pressure to 8 tons and repeating the process three times; the targets were then sintered at 1260 °C to improve their consistency. They were irradiated for up to 120 min to obtain different thicknesses, using in all cases a pulse frequency of 10 Hz and an energy density of 3.2 J/cm². Substrates were maintained at a temperature of 460 °C. Coatings of synthetic hydroxyapatite (Plasma Biototal Capital-R) were also prepared at 0.45 mbar to be used as reference material, labeled as Ref-HA coatings.

The fluor-carbonated HA coatings, labeled as Bio-FHA, were deposited on titanium alloy (Ti₆Al₄V) discs with dimensions of 4.8 mm diameter and 1 mm thickness. Before being placed inside the PLD

vacuum chamber, the substrates were cleaned by 7-minute sonication cycles using 5% nitric acid, methanol or acetone, interspersed by cycles of rinsing in distilled water. Prior to deposition, the chamber atmosphere was lowered to a pressure of 10^{−4} mbar and subsequently filled with a H_2O vapor atmosphere, varying the pressures as follows: 0.0, 0.15, 0.25, 0.35 and 0.45 mbar.

2.2. Physicochemical characterization

The morphology of the coatings was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) using a JEOL JSM-6700F microscope. Interferometric profilometry was used to determine the thickness mean values of the different coatings. Three profiles per condition (coating type on silicon as substrate due to technical requirements) were measured in a non-contact high resolution optical profilometer (WYKO NT-1100). Structural and compositional measurements were taken by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR, Bruker IFS-28) in the range of 550 to 5000 cm^{−1}, using silicon as substrate due to technical requirements; X-ray diffraction (XRD, Siemens D-5000 Diffractometer); and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS, Thermo Scientific K-ALPHA ESCA). All these measurements were performed on the complete series of coatings at different H_2O vapor pressures in order to evaluate the dependence of physicochemical properties on variations in pressure.

The bioceramic target had previously been characterized [36–38]; a semi-quantitative evaluation established the main contribution as a 91% apatitic phase of fluorapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$). The XRD typical reflections were located at 21.8, 22.9, 25.8, 28.1, 29.0, 31.9, 32.2, 33.0 and 34.1°, corresponding respectively to the (2,0,0), (1,1,1), (0,0,2), (1,0,2), (2,1,0), (1,2,1), (1,1,2), (3,0,0) and (2,0,2) diffraction planes [39, 40]. The 9% non-apatitic phase was attributed to tricalcium bis (orthophosphate), $\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$, and/or whitlockite, $\text{Ca}_{18}\text{Mg}_2\text{H}_2(\text{PO}_4)_{14}$, with typical reflections at 27.84 and 31.16°, corresponding respectively to the (2,0,8) and (0,2,10) diffraction planes [41]. In relation to its composition (XPS), electronic transitions associated with the main elements of calcium phosphate bioceramics (Ca_{2p} and P_{2p}) and other minority elements (F_{1s} , Na_{1s} and Mg_{1s}) were quantified (in at.%) as 16.93, 14.16, 2.09, 2.75 and 1.40, respectively. The binding energy (BE) at 684.66 eV corresponded to F_{1s} . According to the literature [42], a binding energy of 684.20 eV indicates that fluoride ions are incorporated into the HA lattice structure. A slightly higher value was obtained in our target due to the charge correction process.

2.3. Biological characterization: response of pre-osteoblastic cells

Bio-FHA and Ref-HA coatings obtained at 0.45 mbar were subjected to gamma sterilization and incubated with the pre-osteoblastic cell line MC3T3-E1 (ECACC, catalog No.: 99072810). Cells were regularly cultured in alpha minimum essential medium (α -MEM Lonza) supplemented with 10% (vol/vol) of fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) and with a 2% combination of amphotericin B, penicillin and streptomycin (Invitrogen, catalog 15,240–062), at 37 °C and 5% of CO_2 in a humidified atmosphere. Four replicates were evaluated per coating and per condition. Tissue culture polystyrene (TCP) was used as a control experiment for the healthy stage of cells. The culture medium was renewed every 2 to 3 days.

2.4. Cell morphology

Cell morphology on the coatings was evaluated by SEM and confocal laser scanning microscopy (CLSM), with a direct seeding of 100 μl of cell suspension 1.7×10^5 cells/ml in 96-well tissue culture microplates. For SEM evaluation after 7 and 21 days of incubation, the culture medium was removed and cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde solution in phosphate buffered saline (PBS, Lonza) for 2 h at 4 °C. Samples were washed three times for 30 min each with PBS. After

fixation, they were subjected to dehydration by replacing the PBS with a graded series of ethanol (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100%) for 30 min each. The process was followed by a chemical dehydration series of 100% ethanol and hexamethyldisilazane (HMDS, Ted Pella, USA) at concentrations of 25, 50 and 75% for 15 min each, ending with immersion in 100% HMDS for 30 min. Finally, the coatings were left to dry overnight and were affixed to aluminum stubs for examination via SEM Philips XL30. The cytoskeleton was evaluated by CLSM (Bio-Rad MRC 1024) after 20 days of culture. At that time, cells were fixed with 4% paraformaldehyde solution for 10 min at room temperature, after which they were permeabilized for 5 min with 0.1% (vol/vol) Triton X-100 in PBS buffer $1 \times$. Alexa Fluor 488 phalloidin solution was added for 20 min in darkness in order to visualize actin filaments. After incubation, cell nuclei were labeled with propidium iodide solution for 5 min in darkness.

2.5. Cell proliferation

To evaluate their proliferation, cells were first directly seeded on the coatings and incubated with a volume of 100 μ l of cell suspension 1.7×10^5 cells/ml in 96-well tissue culture microplates. Using new 96-well tissue culture microplates, proliferation was then quantified after incubation periods of 7 and 21 days using the methyl thiazol tetrazolium method (MTT assay, Roche); the tetrazolium component in living cells is reduced by mitochondrial into a purple formazan product. After overnight incubation, samples were removed and the resulting colored solution quantified as optical density values using a Bio-Rad Model 550 microplate spectrophotometer. These data were normalized per cm^2 due to the different areas of coatings and TCP controls.

2.6. Cell differentiation

Cell differentiation of osteoblasts was determined after 7 and 21 days using the Alkaline Phosphatase (ALP) Assay Kit (Abcam), an early osteogenic differentiation marker. To induce differentiation 1 day after seeding, ascorbic acid 2-phosphate (Sigma-Aldrich, 2 mM) and glycerol 2-phosphate (Sigma-Aldrich, 10 mM) were added to the α -MEM medium. In order to obtain cell lysates, discs were carefully rinsed three times with PBS (Lonza) and subjected to osmotic and thermal shocks with sterile ultrapure water. Using a Bio-Rad Model 550 microplate spectrophotometer, cell lysates were then used to quantify the activity of the ALP enzyme using the spectrophotometric assay based on the conversion of *p*-nitrophenyl-phosphate to *p*-nitrophenol.

2.7. Biological characterization: response of bacterial strains

To perform the experiment, strains of *Staphylococcus aureus* 15981 (*S. aureus*) and *Staphylococcus epidermidis* 35984 (*S. epidermidis*) were used on the Bio-FHA and Ref-HA coatings that had previously been placed in a 96-well plate (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Biofilms of each species were formed by transferring to the coatings 200 μ l containing 10^6 colony forming units of each strain per ml (CFU/ml of initial concentration), incubated in tryptic soy broth (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) and supplemented with 1% glucose. After 24 h of incubation at 37 °C and 5% CO_2 , the medium was removed and samples were washed three times with 200 μ l 0.9% NaCl sterile saline (B. Braun, Melsungen, Germany). Biofilms were disrupted by sonication with an Ultrasons-H 3000840 low-power bath sonicator (J. P. Selecta, Barcelona, Spain) at 22 °C for 5 min [39]. The CFU/ cm^2 values were estimated by the drop plate method [40]. These assays were performed in triplicate.

A morphological evaluation of the biofilms was also carried out after 24 h; they were fixed using glutaraldehyde (2.5%) in sodium cacodylate buffer (0.1 M) at pH 7 at room temperature for 2 h. After fixation, samples were subjected to dehydration by replacing the buffer with a graded series of ethanol (30, 50, 70, 90 and 100%) for 10 min

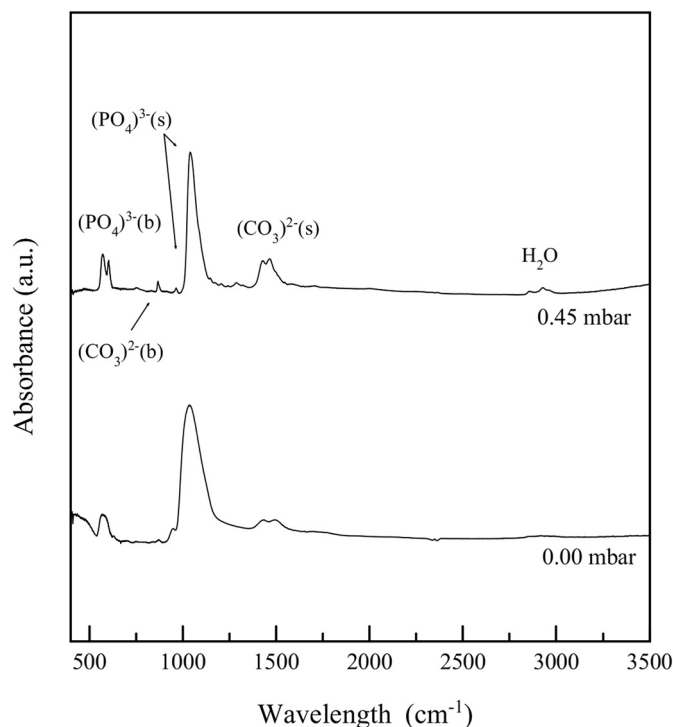


Fig. 1. FTIR spectra of Bio-FHA coatings deposited at H_2O vapor pressures of 0.00 and 0.45 mbar during the PLD process.

each at room temperature. Finally, the biofilms were left to dry overnight, affixed to aluminum stubs and coated with platinum using a Bal-Tec MED020, for SEM analysis in JEOL JSM-6700 equipment.

2.8. Statistical analysis

Data on the pre-osteoblasts are presented as mean values \pm standard error of the mean. Statistical differences were evaluated using SPSS Statistics (vs. 23.0). In all cases, the significance level was set at 0.05. Each data element was analyzed using the non-parametric Mann–Whitney *U* test. The statistical analysis of bacterial strains was performed using the non-parametric unilateral Wilcoxon's test with a statistical significance level of 0.05. The microbiological data are presented as median and interquartile range.

3. Results and discussion

3.1. Coating characterization: dependence on H_2O vapor pressure

The FTIR spectra of the Bio-FHA coatings deposited at H_2O vapor pressures of 0.45 and 0.0 mbar are presented in Fig. 1. The main vibration modes were identified using previous literature [24, 46–53] as follows: (i) phosphate groups with a strong peak located between 1000 and 1200 cm^{-1} attributed to the asymmetric stretching of P–O bonds, a weak band at 950 cm^{-1} due to symmetric stretching and an absorption band between 550 and 600 cm^{-1} attributed to symmetric bending; (ii) carbonate groups with an absorption band between 1400 and 1500 cm^{-1} attributed to the asymmetric stretching of C–O bonds and a weaker band at 870 cm^{-1} due to asymmetric bending; and (iii) adsorbed water with a characteristic broad band around 3000 cm^{-1} .

The results indicate that at all pressures the bond structure of the coatings was basically a calcium phosphate. However, differences were observed as the H_2O vapor pressure varied. As the vapor pressure increased, the intensity of carbonate bands also increased; the $[\text{CO}_3]^{2-}(\text{s})/[\text{PO}_4]^{3-}(\text{s})$ ratio was 30% higher in the Bio-FHA coating deposited at 0.45 mbar than at 0.00 mbar. At the same time, the full width at half

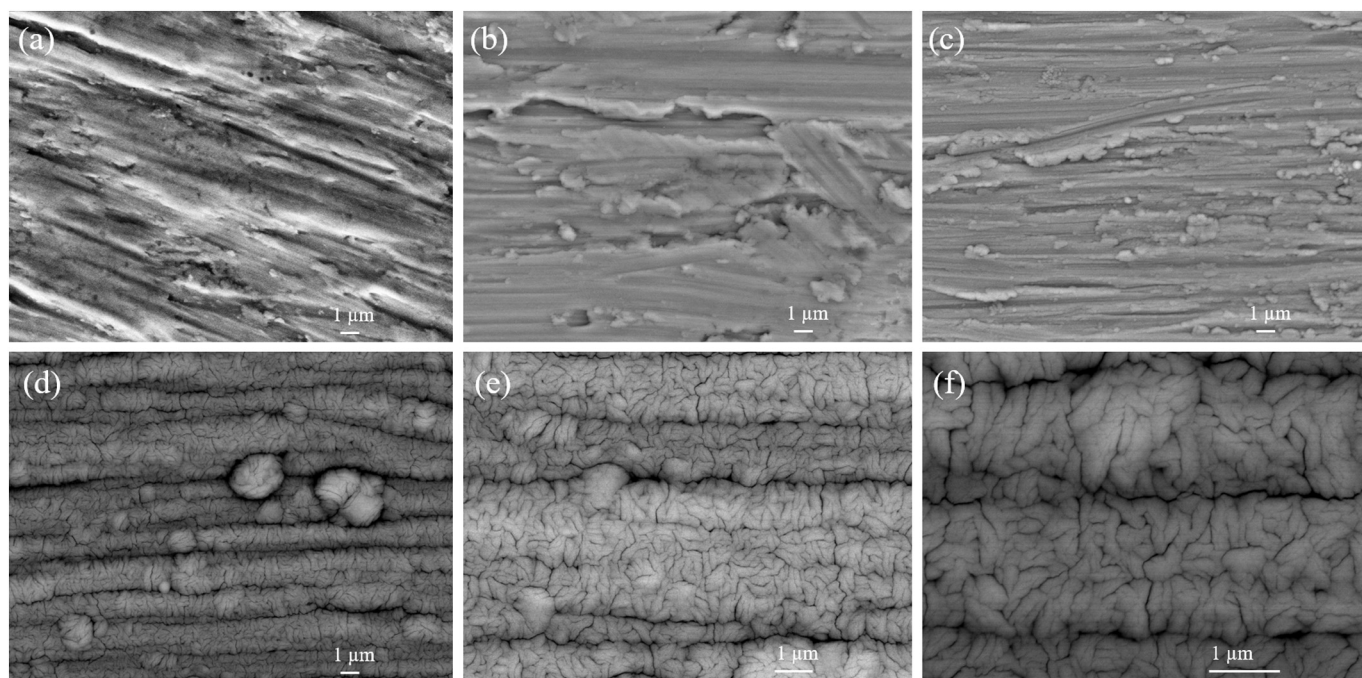


Fig. 2. SEM micrographs of processed titanium alloy substrate (a), the Bio-FHA coatings at 0.00 mbar for 30 min (b), at 0.45 mbar for 30 min (c), and at 0.45 mbar for 120 min (d–f). Magnifications of 5000 \times (a–d), 10,000 \times (e), 20,000 \times (f).

maximum (FWHM) of the main peak of PO_4^{3-} groups (asymmetric stretching) decreased by about 70% for the Bio-FHA coating deposited at 0.45 mbar than at 0.00 mbar. A better definition of the PO_4^{3-} bending band was also observed, indicating that the short-range order in the structure was enhanced.

Morphology was analyzed by SEM and results are displayed in Fig. 2: a micrograph of the surface of the processed titanium alloy substrate (a), the Bio-FHA coatings processed at 0.00 mbar for 30 min (b), at 0.45 mbar for 30 min (c) and at 0.45 mbar for 120 min at three magnifications (d–f). As can be seen, the surface morphology of the tested coatings was composed of aggregates of globular shape, typical of a HA film (b–f). Moreover, coatings grew following the topography of the processed substrate (a). For the coating deposited at 0.45 mbar for 120 min (d–f), globular morphology with ridges and valleys following the direction of the topography of the processed titanium substrates can be clearly observed (d). Increased magnifications (10,000 \times and 20,000 \times) revealed that the coating was composed of elongated structures of < 1 μm in length (e) and (f).

Evidence provided by the FTIR analysis and the SEM evaluation, confirming the presence of phosphate groups and the typical globular morphology of calcium phosphate, agreed with previous studies that have obtained coatings by the same technique [20, 24, 34, 50, 53, 54]. The elongated structures of < 1 μm in length observed in the present study could potentially be attributed to the aligned faceted crystals already described by Lopez-Alvarez et al. These crystals, of approx. 0.5–1.0 μm in one dimension and 4–10 μm in the others, are part of the shark enameloid structure [37, 38] where fluorine is present in the bioceramic [36–38].

The thickness value obtained by interferometric profilometry for the Bio-FHA coatings deposited at 0.45 mbar of H_2O vapor pressure for 30 min was $0.11 \pm 0.01 \mu\text{m}$, while for those processed at 0.00 mbar the value was $0.54 \pm 0.05 \mu\text{m}$. The deposit rate was 3.5 nm/min for the coatings processed at 0.45 mbar, and 18.1 nm/min for those processed at 0.00 mbar. These results indicate that increased H_2O vapor pressure diminishes the thickness of the coatings. The thicknesses obtained in both conditions were much lower than the profile of the processed titanium alloy substrates, which is why both coatings adapt perfectly to the substrate topography without modifying it.

The crystallinity of the coatings was analyzed by XRD. A defined crystalline structure with clear, sharp and intense peaks was found for the coatings deposited above 0.25 mbar. For the coatings deposited below this H_2O vapor pressure, the spectra revealed the presence of a unique wide band. Fig. 3 depicts XRD spectra in the range of 20 to 35 $^\circ$ for the Bio-FHA coatings deposited at 0.45 and 0.00 mbar. As can be seen, Bio-FHA coatings processed at 0.45 mbar reveal the typical reflections associated with apatite structures, such as hydroxyapatite $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, carbonated-hydroxyapatite or fluorapatite $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$, located at 29.4, 32.1 and 33.4 $^\circ$, corresponding respectively to the (2,1,0), (1,1,2) and (3,0,0) diffraction planes [20, 41, 46, 49, 53, 55–58].

For a more detailed analysis, the diffraction peak at plane (1,1,2) was selected to estimate the crystallite size (τ) on the processed coatings at different H_2O vapor pressures using the Scherrer equation (1):

$$\tau = K \lambda / B \cos \theta \quad (1)$$

where λ is the wavelength of the incident radiation, θ is the Bragg angle and B is the FWHM of the peak intensity corresponding to the (1,1,2) reflection. The single-crystal sizes obtained were 65 nm for the Bio-FHA coatings processed at 0.45 mbar, and 17 nm at 0.00 mbar; the values for 0.35, 0.25 and 0.15 mbar were 48, 43 and 20 nm respectively. Crystallite size therefore increases as H_2O vapor pressure increases, meaning that the crystallinity of these coatings can be modified depending on the pre-defined pressure.

These results were in good agreement with those obtained in the FTIR analysis (Fig. 2), where defined bands were also observed with the progressive incorporation of H_2O vapor pressure. It is well known that a HA structure needs OH ions to stabilize its crystalline structure. In the PLD process, the presence of a H_2O vapor atmosphere reduces the kinetic energy of the species (which could influence the deposit rate, promoting a decrease in thickness), enhancing the crystalline quality of the films [16]. It is also well known [43, 44] that the water forms a ternary equilibrium with the CaO and P_2O_5 groups. Phase diagrams of CaO and P_2O_5 show the reactivity of calcium orthophosphates with humidity at high temperatures, following reactions such as:

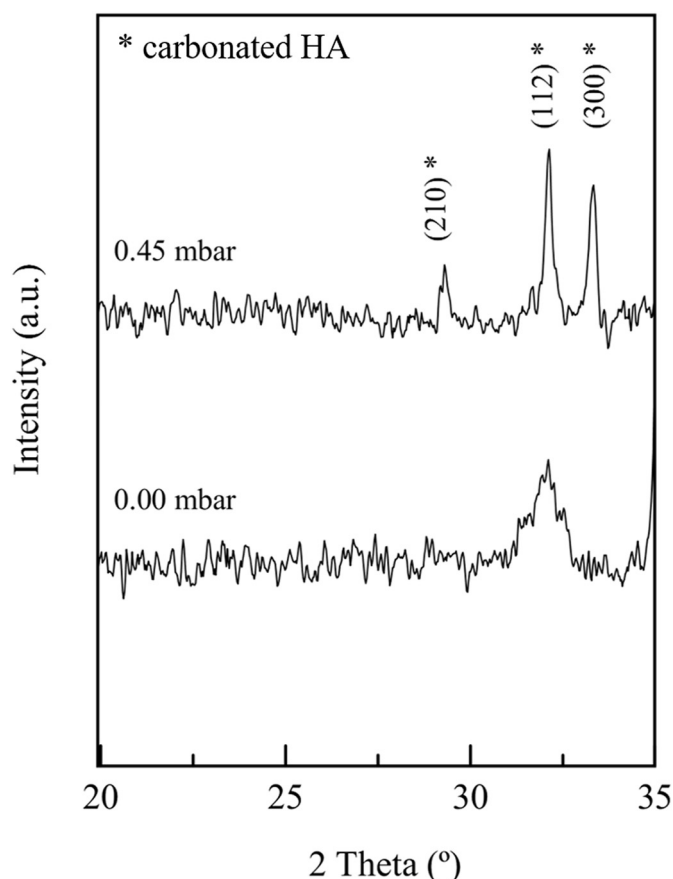
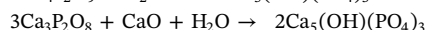
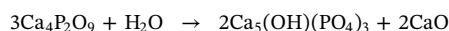


Fig. 3. XRD patterns of Bio-FHA coatings deposited at H₂O vapor pressures of 0.45 and 0.00 mbar during the PLD process.



When the crystalline structures of the ablation target were compared with those obtained for the coatings, the presence of diffraction planes—(2,1,0), (1,1,2) and (3,0,0)—on the Bio-FHA coatings processed at 0.45 mbar (and also at 0.25 and 0.35 mbar) confirmed the efficient material transference from the target to the coatings. It is worth highlighting that the single-crystal size of 65 nm estimated for the Bio-FHA coatings processed at 0.45 mbar was close to that reported for the original bioceramic of pyrolyzed shark enameloid (60 nm) [36].

Finally, the compositional analysis performed by XPS enabled the identification and atomic percentage quantification of the elements present in the Bio-FHA coatings. As can be seen from the quantitative evaluation in Table 1, the chemical composition of the whole series of Bio-FHA coatings was based on Ca, P and also F, with the incorporation of Na for pressures ≥ 0.25 mbar, and of Mg at the highest tested pressure (0.45 mbar).

Table 1

Atomic percentages of main elements of Bio-FHA coatings processed at H₂O vapor pressures of 0.00 to 0.45 mbar determined by XPS.

Bio-FHA coatings		Composition (at.%)					Ca/P ratio
		Ca _{2p}	P _{2p}	F _{1s}	Na _{1s}	Mg _{1s}	
Vapor pressure (mbar)	0.45	17.98	9.89	1.96	0.95	0.86	1.82
	0.35	17.48	9.92	2.28	0.55	–	1.76
	0.25	15.14	7.63	1.33	1.06	–	1.98
	0.15	15.76	4.13	1.17	–	–	3.82
	0.00	17.39	5.02	1.28	–	–	3.46

When the composition of the ablation target (shown in Materials and Methods section) was compared with that of the coatings, it was found that the five elements were successfully transferred only in the Bio-FHA coatings processed at 0.45 mbar. In other words, higher H₂O vapor pressures during the PLD processing favored the incorporation of Ca, P and F, as well as minority elements (Na, Mg). It is interesting to note that the coatings deposited at 0.35 and 0.45 mbar of H₂O vapor pressure presented a Ca/P ratio of around 1.8, whereas it was 1.2 in the case of the ablation target. The Ca/P ratio therefore approaches that of sintered synthetic carbonated hydroxyapatite, Ca/P = 1.7 [16], when the pressure is increased to 0.35–0.45 mbar. The same tendency of lower Ca/P ratios with higher pressures has already been reported for synthetic calcium phosphate coatings obtained by PLD at 0.15 to 0.80 mbar, explained by the fact that more phosphorus can be retained in the coating [16]. In the same way as the crystalline structure, the composition is also affected by the H₂O vapor pressure used. During the PLD process, this atmosphere facilitates the control of film stoichiometry by promoting a hydration reaction between the film species and H₂O or its decomposition products.

High-resolution XPS spectra of the F_{1s} electronic transition for the complete H₂O vapor pressure series of Bio-FHA coatings are presented in Fig. 4. The results confirmed that the BE for the F_{1s} transition shifted slightly towards lower energies, from 685.05 to 684.69 eV, as the H₂O vapor pressure increased.

Note that the high BE (685.05 eV) of coatings deposited with reduced or null H₂O vapor pressure, when compared with the target (684.20 eV), could be attributable to a different compound, for instance CaF₂ [51]. Note also that hydroxyl groups from the H₂O vapor atmosphere are known to replace groups of PO₄^{3−}, F[−] or CO₃^{2−}.

Based on the FTIR, XRD and XPS results and the referenced literature, the composition of our Bio-FHA coatings—deposited by PLD at 0.35 and 0.45 mbar of H₂O vapor pressure onto a marine bioceramic of pyrolyzed enameloid shark teeth—can be defined as a hydrated and fluorinated carbonated hydroxyapatite.

The role of water vapor pressure in producing fluorinated carbonated hydroxyapatite by PLD can be summarized as follows:

1. The presence of a H₂O vapor atmosphere reduces the kinetic energy of the species, causing a slower deposit rate and enhancing the crystalline quality of the films.
2. A greater number of hydroxyl groups are available in the growth process, allowing the crystalline structure to stabilize more easily.
3. The presence of a H₂O vapor atmosphere allows an ion exchange between OH[−], PO₄^{3−}, F[−] or CO₃^{2−} groups.

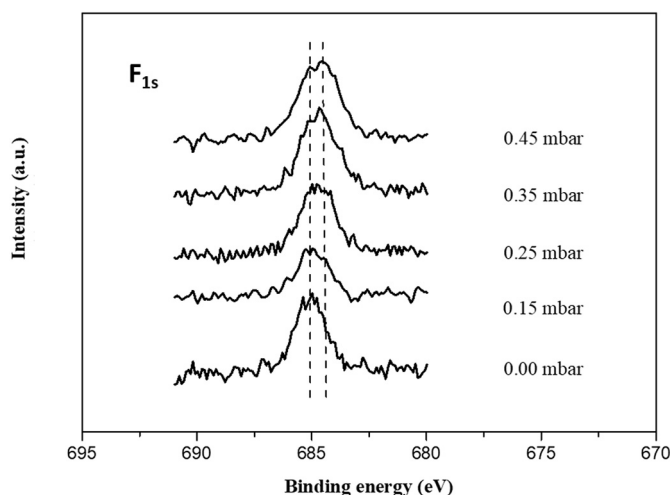


Fig. 4. High-resolution XPS spectra of F_{1s} electronic transition for the complete H₂O vapor pressure series of Bio-FHA coatings.

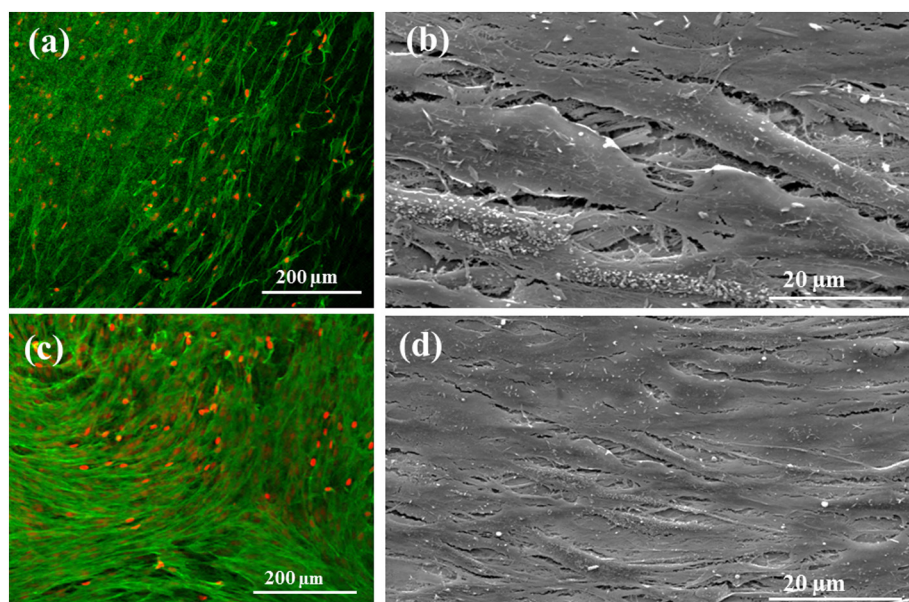


Fig. 5. Morphology of MC3T3-E1 cells on Bio-FHA (a, b) and Ref-HA (c, d) coatings, by CLSM (a, c) after 20 days of incubation, and by SEM (b, d) after 21 days of incubation. In the CLSM micrographs nuclei are stained in red and actin filaments in green. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

- The main substitutions correspond to: (i) CO_3^{2-} ions for PO_4^{3-} and/or OH^- ions and (ii) F^- ions for OH^- ions
- The incorporation of F^- ions produces changes in the lattice structure of fluorinated carbonated hydroxyapatite coatings causing an increase in the crystal size and crystallinity [45].

3.2. Biological response: MC3T3-E1 pre-osteoblast viability

The Bio-FHA coatings processed at 0.45 mbar were selected for the biological evaluation, because of their proven crystallinity and good transference from the ablation target, including the incorporation of minority elements such as Na and Mg. Ref-HA coatings and TCP were also subjected to the experiments as material and experimental controls, respectively.

Fig. 5 presents the morphology of MC3T3-E1 cells on Bio-FHA (a, b) and Ref-HA (c, d) coatings, by CLSM (a, c) and by SEM (b, d). The cytoskeleton of the cell monolayers on both coatings stained in red (nuclei) and green (actin filaments) revealed a degree of elongation of actin filaments that appeared to be following the topography of the Bio-FHA coatings (a), as already depicted in Fig. 2. SEM of the same Bio-FHA coating (b) confirmed the typical flat morphology of cells that have formed a thick layer covering the entire coating. In the case of the Ref-HA coatings, the distribution of actin filaments forming a honeycomb-like structure is observed on the CLSM micrograph (c), and again a monolayer covering the entire coating (d) confirmed the healthy stage of cells.

Both coatings were proven to promote healthy morphology on the cells at the noted times of incubation; cells made contact with neighboring cells and covered the entire surface of their respective coatings (Bio-FHA and Ref-HA). The typical flat morphology of osteoblasts confirmed their healthy stage on both materials [50]. The morphology of the Bio-FHA coatings (Fig. 2), based on ridges and valleys following the direction of the topography of processed titanium substrates and composed of elongated structures of $< 1 \mu\text{m}$ in length, could contribute to the particular alignment observed in the cells' morphology. It is known from the literature that the topography strongly influences the morphology and functional activity of pre-osteoblasts, and that roughness favors osteogenic activity [59]. The literature has also reported on the orientation and aligned growth of osteoblasts on polymers or different ceramics [60, 61].

Cell proliferation was quantified after 7 and 21 days and results are presented in Fig. 6. After 7 days of incubation an intense proliferation of

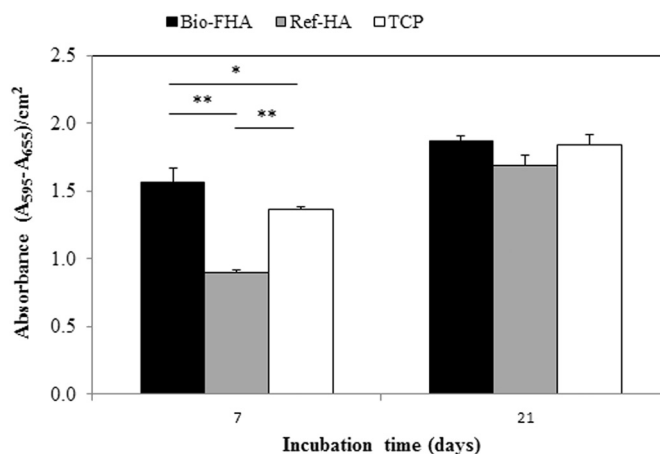


Fig. 6. MTT assay results after incubation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts on Bio-FHA and Ref-HA coatings for 7 and 21 days. TCP was used as control. Data are presented as mean \pm standard error of the mean. Significant statistical differences for $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) are shown.

cells was observed on the Bio-FHA coatings; it was significantly higher ($p < 0.01$) than the proliferation on the Ref-HA coatings or the TCP control. After 21 days, all tested materials had higher values than on day 7, with both coatings at the same level as the TCPs. The proliferation values obtained for TCPs after both incubation periods of 7 and 21 days were as expected for this gold standard control. This control therefore confirms the healthy stage of cells throughout the experiment, and their good response when seeded on the two tested coatings at long periods of incubation.

Synthetic fluor-hydroxyapatite contributions on different materials have previously been tested in the literature, with good results in terms of proliferation, validating its non-cytotoxic behavior [1, 46, 52]. Biological fluorapatite obtained from shark enameloid has also performed well as granules and powder in in vitro tests [38]. Compared to these granules and powder, the Bio-FHA coatings in this study had compositional differences in terms of crystallinity, due to the processing conditions used to obtain them. Given the influence of H_2O vapor pressure demonstrated in this study, hydroxyl groups are thought to compete with PO_4^{3-} groups, promoting a Bio-FHA structure instead of Bio-FA (Fig. 4). The content of F (1.96 at.%), Na (0.95 at.%) and Mg (0.86 at.%) found in our Bio-FHA coatings resembled that of a previous

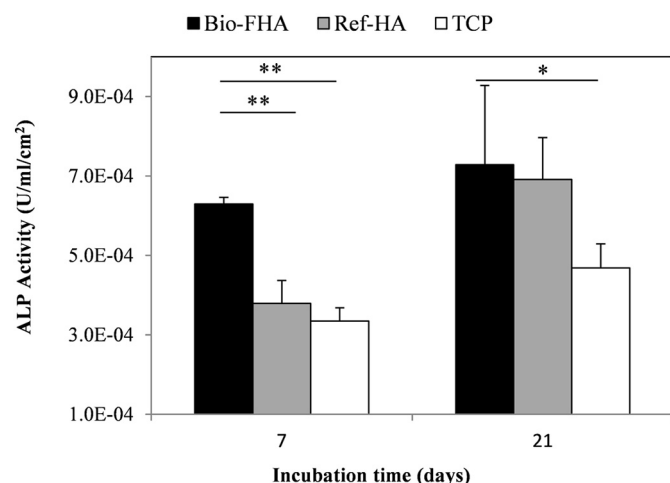


Fig. 7. ALP activity of MC3T3-E1 pre-osteoblasts on Bio-FHA and Ref-HA coatings, at 7 and 21 days. TCP was used as a control. Data are presented as mean \pm standard error of the mean. Significant statistical differences for $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) are shown.

study on bioceramics from shark teeth [37], where values were 1.0 ± 0.5 at.% for F, 0.90 ± 0.2 at.% for Na and 0.65 ± 0.04 at.% for Mg. These findings support the proven stoichiometric transference of the PLD methodology [16, 25]. These contributions could explain the intense osteoblastic proliferation on Bio-FHA coatings, compared to Ref-HA, after just 7 days of incubation (Fig. 6). The effect of fluoride on cell proliferation has previously been studied by Lau and Baylink [62], who demonstrated how fluoride contribution in concentrations of 0–30 μ M of fluoride increased bone cell proliferation.

Osteogenic activity of the MC3T3-E1 pre-osteoblasts on both coatings (Bio-FHA and Ref-HA) was evaluated by quantifying ALP activity at 7 and 21 days of incubation (Fig. 7). After 7 days of incubation, significant ALP activity ($p < 0.01$) was quantified on the Bio-FHA coatings compared to both the Ref-HA and TCP, which presented lower values in the same range. After 21 days of incubation, ALP activity increased in mean values on the two coatings and the TCP controls. However, the Bio-FHA and Ref-HA coatings showed higher levels of ALP activity ($p < 0.05$) than the TCP values. These results demonstrate the effective promotion of osteogenic activity by MC3T3-E1 pre-osteoblasts when seeded on Bio-FHA coatings after 7 and 21 days of incubation. The structure and morphology of fluor-hydroxyapatite, along with the contributions of F and minority elements Na and Mg, seemed to accelerate osteogenic activity.

In keeping with these results, several authors have previously reported on the promotion of cell proliferation and differentiation processes by synthetic FHA coatings [1, 46]. The differentiation of dental pulp stem cells and mesenchymal stem cells (MSCs) into osteoblasts was also observed on synthetic fluorapatite surfaces, where cells were able to successfully differentiate and mineralize [2, 54, 63, 64]. Ellingsen et al. [2] concluded that the presence of fluorine could contribute to bone healing and regeneration by inducing the differentiation of undifferentiated precursor cells into osteoblasts. In our case, the osteogenic activity of MC3T3-E1 pre-osteoblasts was already quantified at 7 days of incubation.

3.3. Biological response: antibacterial properties

To evaluate the antibacterial activity of the Bio-FHA and Ref-HA coatings, adhesion and biofilm formation were analyzed after incubation with *S. aureus* and *S. epidermidis*. The adhesion of both strains was first evaluated by SEM analysis and the results are displayed in Fig. 8, where micrographs (a, b) correspond to Bio-FHA and (c, d) to Ref-HA coatings; micrographs (a, c) relate to *S. epidermidis* and (b, d) to *S.*

aureus. Cocci, diplococci (white arrows) and aggregates were detected on both coatings. The presence of aggregates was observed especially on *S. aureus* (b, d). A slightly higher density of bacteria was detected on the Ref-HA coatings compared to the Bio-FHA (white squares).

The median number of CFUs for each coating and both bacterial strains was quantified after 24 h at 37 °C. As illustrated in Fig. 9, the adherence of *S. aureus* was significantly higher ($p < 0.05$) than *S. epidermidis* in both coatings. For *S. aureus*, there was a significant 3.6-fold reduction in biofilm formation on Bio-FHA (\log_{10} CFU/cm² = 8.11) compared to Ref-HA (\log_{10} CFU/cm² = 8.67) ($p = 0.0425$). In the case of *S. epidermidis*, the results showed a significant 2.4-fold reduction in biofilm formation on Bio-FHA (\log_{10} CFU/cm² = 6.87) compared to Ref-HA (\log_{10} CFU/cm² = 7.25) ($p = 0.0248$).

These results were in keeping with previous studies that have demonstrated the antibacterial effect of fluorine against oral bacteria [4–10]. In our research, the 1.96 at.% of fluorine was proven to be significantly effective against the species of bacteria responsible for 77% of infections in prosthetic implants. The contributions of other minority elements as a result of the biological origin of the target, together with the globular morphology and crystalline structure of the Bio-FHA coatings after PLD processing at 0.45 mbar of H₂O vapor pressure, contributed to the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts and kept the antibacterial properties of fluorine intact.

4. Conclusions

This study demonstrated both the feasibility of producing PLD coatings (Bio-FHA) from shark tooth enameloid in a H₂O vapor atmosphere and good compositional transference from the original bioceramic. It also showed how the coatings' composition and crystalline structure depended on the H₂O vapor pressures applied during the process. Increased pressure meant increased crystallinity: at the highest pressure of 0.45 mbar, more defined bands attributed to apatite diffraction planes, and crystallite sizes of up to 65 nm were detected. Higher pressures also resulted in a more efficient compositional transference from the target (even minority elements such as Na and Mg were transferred, in addition to Ca, P and F), the incorporation of carbonate groups and H₂O to the composition and, as a consequence, a decrease in the Ca/P ratio to values of around 1.8. When processed at 0.35–0.45 mbar, the original fluorapatite (with small contributions of tricalcium bis(orthophosphate) and/or whitlockite) of the shark tooth enameloid became a hydrated fluorinated carbonated hydroxyapatite. Compared to the synthetic hydroxyapatite coatings, the composition of the Bio-FHA coatings processed at 0.45 mbar, as well as the globular morphology of ridges, valleys and elongated structures of < 1 μ m in length, were shown to significantly ($p < 0.01$) favor the proliferation and ALP synthesis of MC3T3-E1 pre-osteoblasts after a short period. At the same time, it was demonstrated that the 1.96 at.% of F promoted a significant reduction in biofilm formation ($p < 0.05$) by *S. aureus* and *S. epidermidis*. These results confirmed the antibacterial properties of the Bio-FHA coatings, their in vitro biocompatibility in terms of proliferation and differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts, and their great potential for biomedical applications.

Acknowledgements

This research was partially supported by 0245 IBEROS1E and 0302 CVMARIIP, both from the INTERREG V Spain-Portugal (POCTEP) program; and Competitive Reference Groups (GRC) ED431C 2017_51 and Research networks ED431D 2017/13 both from the Xunta de Galicia, Spain. Hidalgo-Robatto B. M. acknowledges funding support from Xunta de Galicia pre-doctoral grant (A-2014). Technical support from CACTI (Universidade de Vigo) and J. Dorado are also gratefully acknowledged.

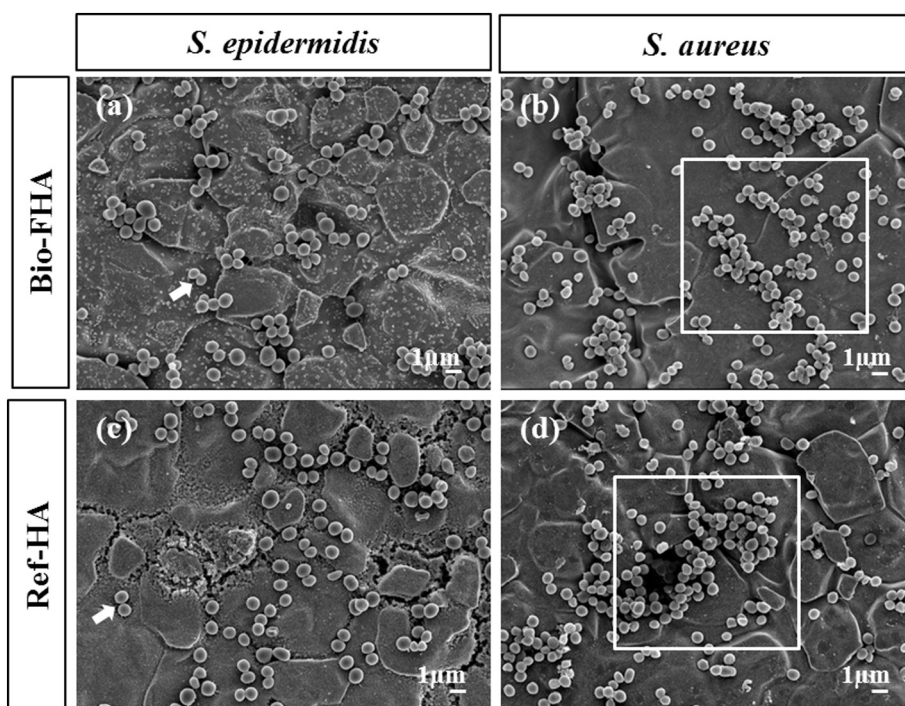


Fig. 8. SEM micrographs of *S. epidermidis* (a, c) and *S. aureus* (b, d) on Bio-FHA (a, b) and Ref-HA (c, d) coatings. White arrows indicate diplococci and white squares indicate areas with aggregates.

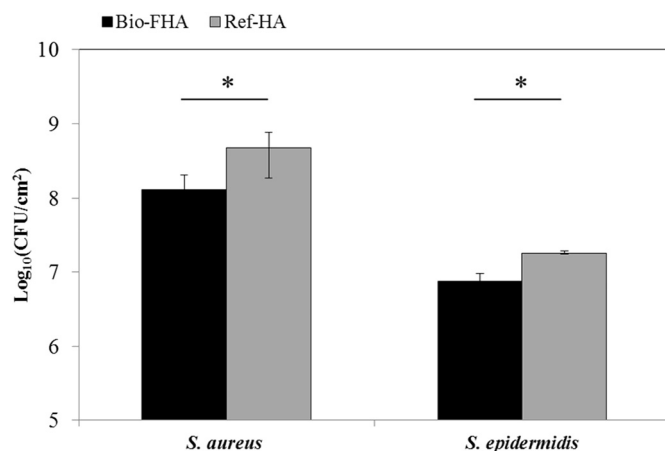


Fig. 9. Log₁₀CFU/cm² of *S. aureus* and *S. epidermidis* on Bio-FHA and Ref-HA coatings. Data are presented as median and interquartile range. Significant statistical differences for $p < 0.05$ (*) are shown.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.06.047>.

References

- [1] P. Yin, F.F. Feng, T. Lei, X.H. Zhong, X.C. Jian, Osteoblastic cell response on bi-phasic fluorhydroxyapatite/strontium-substituted hydroxyapatite coatings, *J. Biomed. Mater. Res. A* 102 (2014) 621–627.
- [2] J.E. Ellingsen, P. Thomsen, S.P. Lyngstadaas, S. Petter Lyngstadaas, Advances in dental implant materials and tissue regeneration, *Periodontol.* 2000 41 (2006) 136–156.
- [3] L. Gineste, M. Gineste, X. Ranz, A. Ellefrieron, A. Guilhem, N. Rouquet, P. Frayssinet, Degradation of hydroxylapatite, fluorapatite, and fluorhydroxyapatite coatings of dental implants in dogs, *J. Biomed. Mater. Res.* 48 (1999) 224–234.
- [4] P.C. Baehni, Y. Takeuchi, Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases, *Oral Dis.* 9 (Suppl. 1) (2003) 23–29.
- [5] D.J. Bradshaw, P.D. Marsh, R.J. Hodgson, J.M. Visser, Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within in vitro dental bacterial communities and biofilms, *Caries Res.* 36 (2002) 81–86.
- [6] I.R. Hamilton, Biochemical effects of fluoride on oral bacteria, *J. Dent. Res.* 69 (1990) 660–667.
- [7] K. Nakajo, S. Imazato, Y. Takahashi, W. Kiba, S. Ebisu, N. Takahashi, Fluoride released from glass-ionomer cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci, *Dent. Mater.* 25 (2009) 703–708.
- [8] H.M. Kay, M. Wilson, The in vitro effects of amine fluorides on plaque bacteria, *J. Periodontol.* 59 (1988) 266–269.
- [9] R.R. Mayhew, L.R. Brown, Comparative effect of SnF₂, NaF, and SnCl₂ on the growth of *Streptococcus mutans*, *J. Dent. Res.* 60 (1981) 1809–1814.
- [10] S. Shani, M. Friedman, D. Steinberg, The anticariogenic effect of amine fluorides on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms, *Caries Res.* 34 (2000) 260–267.
- [11] G.K. Wilcock, Benefits of total hip replacement to older patients and the community, *Br. Med. J.* 2 (1978) 37–39.
- [12] J.L. Del Pozo, M.S. Rouse, G. Euba, C.-I. Kang, J.N. Mandrekar, J.M. Steckelberg, R. Patel, The electricidal effect is active in an experimental model of *Staphylococcus epidermidis* chronic foreign body osteomyelitis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 4064–4068.
- [13] Y. Abu-Amer, I. Darweh, J.C. Clohisey, Aseptic loosening of total joint replacements: mechanisms underlying osteolysis and potential therapies, *Arthritis Res. Ther.* 9 (2007) S6.
- [14] P. Piscitelli, G. Iolascon, M. Innocenti, R. Civinini, A. Rubinacci, M. Muratore, M. D'Arienzo, P.T. Leali, A.M. Carossino, M.L. Brandi, Painful prosthesis: approaching the patient with persistent pain following total hip and knee arthroplasty, *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* 10 (2013) 97–110.
- [15] R. Narayanan, S.K. Seshadri, T.Y. Kwon, K.H. Kim, Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 85B (2008) 279–299.
- [16] B. León, J.J.A. León, Betty, Pulsed laser deposition of thin calcium phosphate coatings, *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants*, Springer New York, New York, 2009, pp. 101–156.
- [17] M. Manzano, M. Vallet-Regí, Revisiting bioceramics: bone regenerative and local drug delivery systems, *Prog. Solid State Chem.* 40 (2012) 17–30.
- [18] Q. Bao, J. Zhang, The effect of Y2O3 on properties of hydroxyapatite thin films prepared by pulsed laser deposition, *J. Biomimetics, Biomater. Biomed. Eng.* 29 (2016) 22–32.
- [19] N. Fujita, T. Makino, Y. Sakoishi, K. Asano, M. Kusunoki, Pulsed laser deposition of pure fluoroapatite film without OH groups, *Cryst. Res. Technol.* 51 (2016) 215–219.
- [20] B.M. Hidalgo-Robatto, M. López-Álvarez, A.S. Azevedo, J. Dorado, J. Serra, N.F. Azevedo, P. González, Pulsed laser deposition of copper and zinc doped hydroxyapatite coatings for biomedical applications, *Surf. Coat. Technol.* 333 (2018) 168–177.
- [21] A. Janković, S. Eraković, C. Ristoscu, N. Mihailescu Serban, L. Duta, A. Visan, G.E. Stan, A.C. Popa, M.A. Husanu, C.R. Luculescu, V.V. Srdić, D. Janačković, V. Mišković-Stanković, C. Bleotu, M.C. Chifiriuc, I.N. Mihailescu, Structural and biological evaluation of lignin addition to simple and silver-doped hydroxyapatite

- thin films synthesized by matrix-assisted pulsed laser evaporation, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2015) 5333.
- [22] N. Mihailescu, G.E. Stan, L. Duta, M.C. Chifiriuc, C. Bleotu, M. Sopronyi, C. Luculescu, F.N. Oktar, I.N. Mihailescu, Structural, compositional, mechanical characterization and biological assessment of bovine-derived hydroxyapatite coatings reinforced with MgF₂ or MgO for implants functionalization, *Mater. Sci. Eng. C* 59 (2016) 863–874.
- [23] J.V. Rau, I. Cacciotti, S. Laureti, M. Fosca, G. Varvaro, A. Latini, Bioactive, nanostructured Si-substituted hydroxyapatite coatings on titanium prepared by pulsed laser deposition, *J. Biomed Mater Res B Appl Biomater* 103 (2015) 1621–1631.
- [24] C. Rodríguez-Valencia, P. Freixeiro, J. Serra, C.M. Ferreirós, P. González, M. López-Álvarez, In vitro evaluation of the antibacterial and osteogenic activity promoted by selenium-doped calcium phosphate coatings, *Biomed. Mater.* 12 (2017) 15–28.
- [25] E.L. Solla, P. González, J. Serra, S. Chiussi, B. León, J.G. López, Pulsed laser deposition of silicon substituted hydroxyapatite coatings from synthetical and biological sources, *Appl. Surf. Sci.* 254 (2007) 1189–1193.
- [26] A.J. Tande, D.R. Osmon, K.E. Greenwood-Quaintance, T.M. Mabry, A.D. Hanssen, R. Patel, Clinical characteristics and outcomes of prosthetic joint infection caused by small colony variant staphylococci, *MBio* 5 (2014) e01910-14.
- [27] N. Benito, M. Franco, A. Ribera, A. Soriano, D. Rodríguez-Pardo, L. Sorlí, G. Fresco, M. Fernández-Sampedro, M. Dolores del Toro, L. Guío, E. Sánchez-Rivas, A. Bahamonde, M. Riera, J. Esteban, J.M. Baraia-Etxaburu, J. Martínez-Alvarez, A. Jover-Sáenz, C. Dueñas, A. Ramos, B. Sobrino, G. Euba, L. Morata, C. Pigrau, P. Coll, I. Mur, J. Ariza, F. Barcenilla, F. Pérez-Villar, L. Prats-Gispert, R. Cisterna, S. Ibarra, J.M. Santamaría López, J. Cabo, D. García, J. Lora-Tamayo, O. Murillo, S. Pedrero, S. Álvarez-Parrondo, R. Muedra-Font, C. Raya-Fernández, C. Rodríguez-Alonso, A. Moreno, M.A. Blanco-Martínez-de-Morentin, R. Cabo-Magadan, A. Combalia, S. García, J.C. Martínez-Pastor, E. Tornero, J. Merino-Pérez, J.M. Montejo, A. Alíer, J.P. Horcajada, V. Plasencia, L. Puig, A. Blanco Añón, J. García-Cañete, E. Sandoval, M. Fakkas-Fernández, C. Garcés-Zarzalejo, C. Fariñas-Alvarez, M.C. Fariñas, L. Martínez-Martínez, C. Salas-Venero, J. Cobo, P. Ruiz-Carbajosa, M. Jordán, X. Crusi, C. Marinescu, F. Montaner, A. Ramírez, P.S. Corona, M. Lung, M. Muniain-Ezcurrea, C. Peñas-Espinar, A.I. Suárez, R. Álvarez, J.A. Cordero, M. López-Pliego, J. Palomino, A. Puente, Time trends in the aetiology of prosthetic joint infections: a multicentre cohort study, *Clin. Microbiol. Infect.* 22 (2016) 732.e1–732.e8.
- [28] P.L. Tran, A.A. Hammond, T. Mosley, J. Cortez, T. Gray, J.A. Colmer-Hamood, M. Shashtri, J.E. Spallholz, A.N. Hamood, T.W. Reid, Organoselenium coating on cellulose inhibits the formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009).
- [29] J. Barros, L. Grenho, C.M. Manuel, C. Ferreira, L. Melo, O.C. Nunes, F.J. Monteiro, M.P. Ferraz, Influence of nanohydroxyapatite surface properties on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation, *J. Biomater. Appl.* 28 (2014) 1325.
- [30] M. Ribeiro, F.J. Monteiro, M.P. Ferraz, Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions, *Biomater.* 2 (2012) 176–194.
- [31] E.M. Hetrick, M.H. Schoenfish, Reducing implant-related infections: active release strategies, *Chem. Soc. Rev.* 35 (2006) 780–789.
- [32] E. Boanini, M. Gazzano, A. Bigi, Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1882–1894.
- [33] E.L. Solla, B. Rodríguez-González, H. Aguiar, C. Rodríguez-Valencia, J. Serra, P. González, Revealing the nanostructure of calcium phosphate coatings using HRTEM/FIB techniques, *Mater. Charact.* 122 (2016) 148–153.
- [34] I. Pereiro, C. Rodríguez-Valencia, C. Serra, E.L. Solla, J. Serra, P. González, Pulsed laser deposition of strontium-substituted hydroxyapatite coatings, *Appl. Surf. Sci.* 258 (2012) 9192–9197.
- [35] E.L. Solla, J.P. Borrajo, P. González, J. Serra, S. Chiussi, B. León, J.G. López, Study of the composition transfer in the pulsed laser deposition of silicon substituted hydroxyapatite thin films, *Appl. Surf. Sci.* 253 (2007) 8282–8286.
- [36] H. Aguiar, S. Chiussi, M. López-Álvarez, P. González, J. Serra, Structural characterization of bioceramics and mineralized tissues based on Raman and XRD techniques, *Ceram. Int.* 44 (2018) 495–504.
- [37] M. López-Álvarez, E. Vigo, C. Rodríguez-Valencia, V. Outeiriño-Iglesias, P. González, J. Serra, In vivo evaluation of shark teeth-derived bioapatites, *Clin. Oral Implants Res.* 28 (2017) 91–100.
- [38] M. López-Álvarez, S. Pérez-Davila, C. Rodríguez-Valencia, P. González, J. Serra, The improved biological response of shark tooth bioapatites in a comparative in vitro study with synthetic and bovine bone grafts, *Biomed. Mater.* 11 (3) (2016) 035011(1–13).
- [39] J. Esteban, E. Gomez-Barrena, J. Cordero, N.Z. Martín-de-Hijas, T.J. Kinnari, R. Fernandez-Roblas, Evaluation of quantitative analysis of cultures from sonicated retrieved orthopedic implants in diagnosis of orthopedic infection, *J. Clin. Microbiol.* 46 (2008) 488–492.
- [40] B. Herigstad, M. Hamilton, J. Heersink, How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria, *J. Microbiol. Methods* 44 (2001) 121–129.
- [41] J.M. Hughes, M. Cameron, K.D. Crowley, Structural variations in natural F, OH, and Cl apatites, *Am. Mineral.* 74 (1989) 870–876.
- [42] A. Joseph Nathanael, D. Mangalaraj, S.I. Hong, Y. Masuda, Y.H. Rhee, H.W. Kim, Influence of fluorine substitution on the morphology and structure of hydroxyapatite nanocrystals prepared by hydrothermal method, *Mater. Chem. Phys.* 137 (2013) 967–976.
- [43] J.L. Arias, F.J. García-Sanz, M.B. Mayor, S. Chiussi, J. Pou, B. León, M. Pérez-Amor, Physicochemical properties of calcium phosphate coatings produced by pulsed laser deposition at different water vapour pressures, *Biomaterials* 19 (1998) 883–888.
- [44] R.K. Singh, F. Qian, V. Nagabushnam, R. Damodaran, B.M. Moudgil, Excimer laser deposition of hydroxyapatite thin films, *Biomaterials* 15 (1994) 522–528.
- [45] J.H. Shepherd, D.V. Shepherd, S.M. Best, Substituted hydroxyapatites for bone repair, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 2335–2347.
- [46] B.D. Hahn, Y.L. Cho, D.S. Park, J.J. Choi, J. Ryu, J.W. Kim, C.W. Ahn, C. Park, H.E. Kim, S.G. Kim, Effect of fluorine addition on the biological performance of hydroxyapatite coatings on Ti by aerosol deposition, *J. Biomater. Appl.* 27 (2013) 587–594.
- [47] A. Forghani, M. Mapar, M. Kharaziha, M.H. Fathi, M. Fesharaki, Novel fluorapatite-forsterite nanocomposite powder for oral bone defects, *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 10 (2013) 282–289.
- [48] R.Z. Legeros, L.M. Silverstone, G. Daculsi, L.M. Kerebel, In vitro caries-like lesion formation in F-containing tooth enamel, *J. Dent. Res.* 62 (1983) 138–144.
- [49] M. Kheradmandfard, M.H. Fathi, F. Ansari, T. Ahmadi, Effect of mg content on the bioactivity and biocompatibility of Mg-substituted fluorapatite nanopowders fabricated via mechanical activation, *Mater. Sci. Eng. C* 68 (2016) 136–142.
- [50] C. Rodríguez-Valencia, I. Pereiro, R.P. Pirraco, M. López-Álvarez, J. Serra, P. González, A.P. Marques, R.L. Reis, Human mesenchymal stem cells response to multi-doped silicon-strontium calcium phosphate coatings, *J. Biomater. Appl.* 28 (2014) 1397–1407.
- [51] K.J. Roche, K.T. Stanton, Measurement of fluoride substitution in precipitated fluorhydroxyapatite nanoparticles, *J. Fluor. Chem.* 161 (2014) 102–109.
- [52] K.A. Bhadang, K.A. Gross, Influence of fluorapatite on the properties of thermally sprayed hydroxyapatite coatings, *Biomaterials* 25 (2004) 4935–4945.
- [53] J. Wei, J. Wang, W. Shan, X. Liu, J. Ma, C. Liu, J. Fang, S. Wei, Development of fluorapatite cement for dental enamel defects repair, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (2011) 1607–1614.
- [54] Y.F. Niu, L.H. Cao, J. Wei, Y.H. Ma, S.J. Song, W.Z. Weng, H.H. Li, C.S. Liu, J.C. Su, Development of a bioactive composite of nano fluorapatite and poly(butylene succinate) for bone tissue regeneration, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 1174–1181.
- [55] N. Iqbal, M.R. Abdul Kadir, N.H. Bin Mahmood, S. Iqbal, D. Almasi, F. Naghizadeh, H.R. Balaji, T. Kamarul, Characterization and biological evaluation of silver containing fluorapatite nanoparticles prepared through microwave synthesis, *Ceram. Int.* 41 (2015) 6470–6477.
- [56] J. Liu, S.C.F. Rawlinson, R.G. Hill, F. Fortune, Fluoride incorporation in high phosphate containing bioactive glasses and in vitro osteogenic, angiogenic and antibacterial effects, *Dent. Mater.* 32 (2016) 221–237.
- [57] H. Toktamış, D. Toktamış, S.M. Yilmaz, A.N. Yazici, C. Yildirim, Ö. Özbiçki, The investigation of usage of fluorapatite mineral (Ca₅(F)(PO₄)₃) in tooth enamel under the different pre-irradiation thermal treatments, *Thermochim. Acta* 600 (2015) 102–109.
- [58] K. Cheng, S. Zhang, W. Weng, Surface characterization of colloidal-sol gel derived biphasic HA/FA coatings, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18 (2007) 2011–2015.
- [59] E. Martínez, E. Engel, J.A. Planell, J. Samitier, Effects of artificial micro- and nanostructured surfaces on cell behaviour, *Ann. Anat.* 191 (2009) 126–135.
- [60] D. Cordero, M. López-Álvarez, C. Rodríguez-Valencia, J. Serra, S. Chiussi, P. González, In vitro response of pre-osteoblastic cells to laser microgrooved PEEK, *Biomed. Mater.* 8 (2013) 055006.
- [61] M. López-Álvarez, I. Pereiro, J. Serra, A. De Carlos, P. González, Osteoblast-like cell response to macro- and micro-patterned carbon scaffolds obtained from the sea rush *Juncus maritimus*, *Biomed. Mater.* 6 (2011) 045012.
- [62] K.H. Lau, D.J. Baylink, Molecular mechanism of action of fluoride on bone cells, *J. Bone Miner. Res.* 13 (1998) 1660–1667.
- [63] X. Wang, T. Jin, S. Chang, Z. Zhang, A. Czajka-Jakubowska, J.E. Nör, B.H. Clarkson, L. Ni, J. Liu, In vitro differentiation and mineralization of dental pulp stem cells on enamel-like fluorapatite surfaces, *Tissue Eng. Part C Methods* 18 (2012) 821–830.
- [64] J. Liu, T. Jin, S. Chang, A. Czajka-Jakubowska, Z. Zhang, J.E. Nör, B.H. Clarkson, The effect of novel fluorapatite surfaces on osteoblast-like cell adhesion, growth, and mineralization, *Tissue Eng. Part A* 16 (2010) 2977–2986.



Non-Tuberculous Mycobacteria multispecies biofilms in cystic fibrosis: development of an *in vitro* *Mycobacterium abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa* dual species biofilm model

Graciela Rodríguez-Sevilla^{a,*}, Marta García-Coca^a, David Romera-García^a, John Jairo Aguilera-Correa^a, Ignacio Mahillo-Fernández^b, Jaime Esteban^a, Concepción Pérez-Jorge^a

^a Department of Clinical Microbiology, IIS- Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, Spain

^b Department of Epidemiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Mycobacterium abscessus
Pseudomonas aeruginosa
Multispecies biofilms
Cystic fibrosis
Sociomicrobiology

ABSTRACT

Lung disease in cystic fibrosis (CF) is characterized by the progressive colonization of the respiratory tract by different bacteria, which develop polymicrobial biofilms. In the past decades, there has been an increase in the number of CF patients infected with Non-Tuberculous Mycobacteria (NTM). Although *Mycobacterium abscessus* is the main NTM isolated globally, little is known about *M. abscessus* multispecies biofilm formation. In the present study we developed an *in vitro* model to study the phenotypic characteristics of biofilms formed by *M. abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa*, a major pathogen in CF. For that purpose, dual species biofilms were grown on polycarbonate membranes with a fixed concentration of *P. aeruginosa* and different inoculums of *M. abscessus*. The biofilms were sampled at 24, 48, and 72 h and bacteria were quantified in specific media. The results revealed that the increasing initial concentration of *M. abscessus* in dual species biofilms had an effect on its population only at 24 and 48 h, whereas *P. aeruginosa* was not affected by the different concentrations used of *M. abscessus*. Time elapsed increased biofilm formation of both species, specially between 24 and 48 h. According to the results, the conditions to produce a mature dual species biofilm in which the relative species distribution remained stable were 72 h growth of the mixed microbial culture at a 1:1 ratio. A significant decrease in mycobacterial population in dual compared to single species biofilms was found, suggesting that *P. aeruginosa* has a negative influence on *M. abscessus*. Finally, in a proof of concept experiment, young and mature dual species biofilms were exposed to clarithromycin.

1. Introduction

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive genetic disorder affecting caucasians (Davies et al., 2007). Lung disease in CF is characterized by the progressive colonization of the respiratory tract by different pathogenic bacteria, which persist due to an impaired ciliary function and increased mucus viscosity, and can cause polymicrobial biofilm-mediated infections in the lower airways (Bhagirath et al., 2016; Burmolle et al., 2010; Burmolle et al., 2014; Peters et al., 2012; Robinson and Bye 2002). These infections seem to be the main stimulus for an exacerbated inflammatory response that causes permanent damage to the lung architecture and function (Bedrossian et al., 1976; Burmolle et al., 2010).

The most frequent isolates from respiratory samples of CF patients

include *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae*, with *P. aeruginosa* causing the most predominant lung infection (Bhagirath et al., 2016). However, this list excludes members of the CF lung environment that are not regularly screened in the clinical laboratory (Peters et al., 2012; Sibley and Surette 2011).

Non-tuberculous mycobacteria (NTM) are ubiquitous organisms that can cause chronic lung infection in susceptible patients. In the past decades there has been an increase in the incidence of NTM-positive cultures from respiratory samples of CF patients, although a precise determination of the incidence and prevalence of NTM lung disease is difficult because disease reporting is generally not mandatory.

The main NTM isolated globally is *Mycobacterium abscessus* (Binder et al., 2013; Koh et al., 2017; Prevots and Marras 2015; Stout et al., 2016), despite the fact that the epidemiology of NTM is linked to a

* Corresponding author.

E-mail address: graciela.rodriguez@fjd.es (G. Rodríguez-Sevilla).

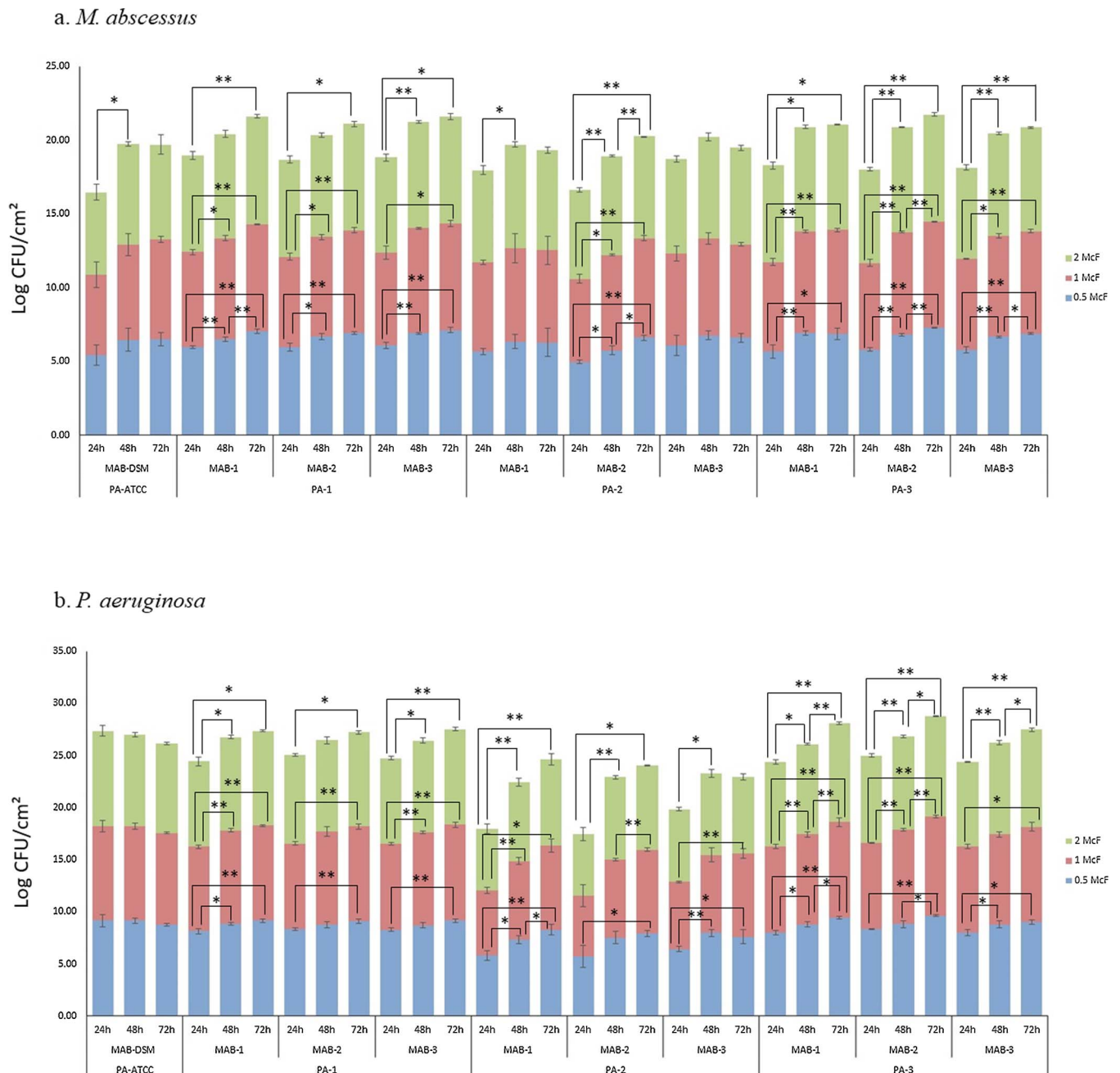


Fig. 1. Effect of time on *M. abscessus* and *P. aeruginosa* dual species biofilms.

Effect of time elapsed of biofilm formation on: a) *M. abscessus* (MAB) and b) *P. aeruginosa* (PA) when developing dual species biofilms with different inoculums of *M. abscessus* (0.5, 1 and 2 McF). *Statistically significant: $p \leq 0.05$ ** Statistically significant: $p \leq 0.01$ (Data shown are average; $n \geq 3$; error bars indicate SD)

substantial geographical variation (Nagano et al., 2017). CF patients infected with *M. abscessus* are associated with increased morbidity and mortality, as well as with a rapid decline in lung function (Esther et al., 2005; Esther et al., 2010; Qvist et al., 2016). Indeed, patients with positive *M. abscessus* cultures are more likely to meet the criteria of the ATS/IDSA guidelines for the diagnosis of NTM lung disease than when infected with other NTM, such as *Mycobacterium avium* complex (Floto et al., 2016; Griffith et al., 2007).

Treatment of *M. abscessus* lung infection is particularly challenging, as it is intrinsically resistant to most antimicrobials (Floto et al., 2016; Griffith et al., 2007; Koh et al., 2017), including those commonly employed to treat lung infection in CF, as well as their doses (Waters and Rajen, 2016).

For NTM recovery by microbiological culture a suitable

decontamination technique is required, but usually fails in individuals with cystic fibrosis given the high density of *P. aeruginosa* and other microorganisms (Buijtel and Petit 2005; De Bel et al., 2013; Oliver et al., 2001; Whittier et al., 1993). In fact, different studies have described that CF patients in which NTM were isolated were coinfecting with microorganisms like *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Aspergillus fumigatus* (Levy et al., 2008; Melloul et al., 2016; Viviani et al., 2016).

M. abscessus biofilm formation in the respiratory zone of the lungs of CF patients has been demonstrated (Qvist et al., 2015). Nowadays is known that biofilm communities tend to be polymicrobial, however, little is known about *M. abscessus* multispecies biofilm formation. In this study, we developed an *in vitro* model to study the dual species biofilm formed by *M. abscessus* and a major CF pathogen (i.e., *P. aeruginosa*).

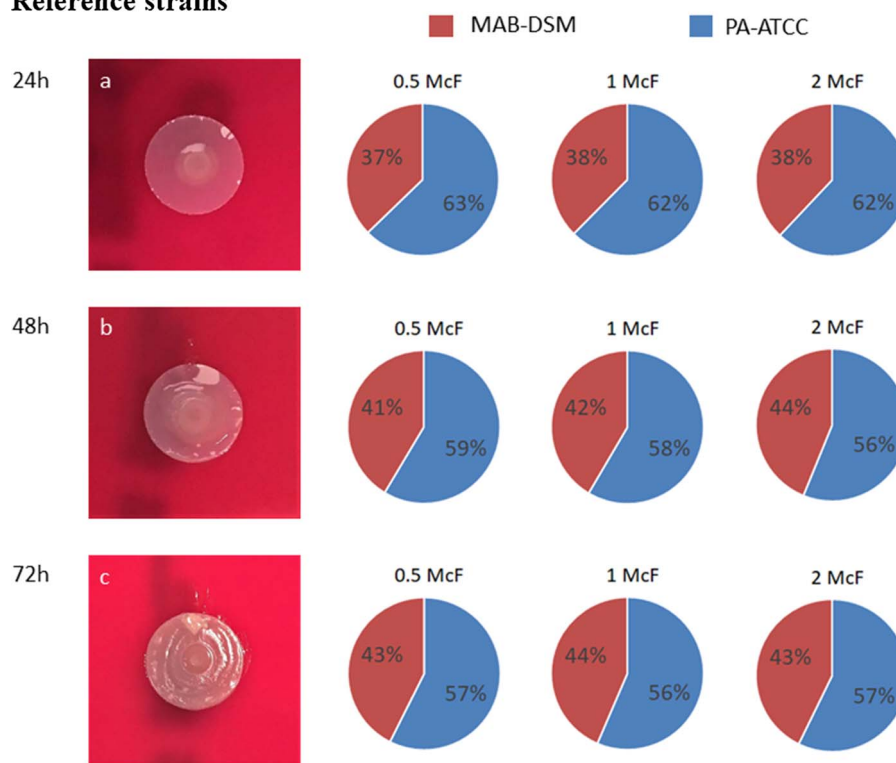
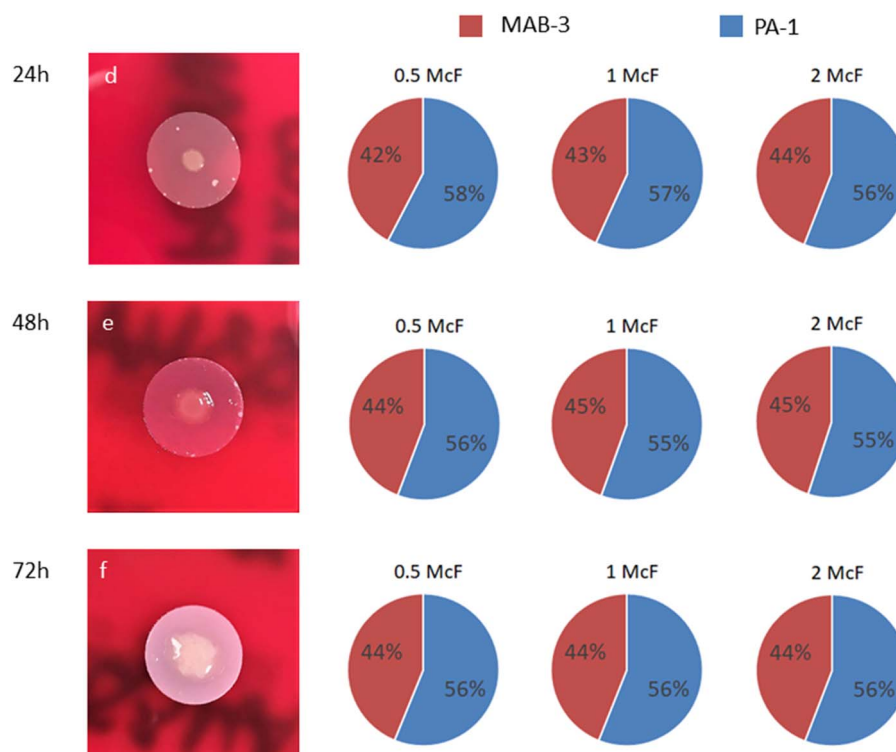
Reference strains**Clinical strains**

Fig. 2. Macroscopic evolution of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* dual species biofilms and changes in community composition over time.

M. abscessus and *P. aeruginosa* dual species biofilms (a-f) grown on polycarbonate membranes in TSS for 24 h, 48 h and 72 h. Pictures a-c represent dual species biofilm formation with the reference strains *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *M. abscessus* DSM 44196 (MAB-DSM/PA-ATCC), while pictures d-f represent dual species biofilm formation with the clinical strains MAB-1/PA-3. Next to the biofilm images, three graphics showing the impact of the different inoculums of *M. abscessus* used for growing the dual species biofilms (0.5; 1 and 2 McF) on community composition are shown at each time point.

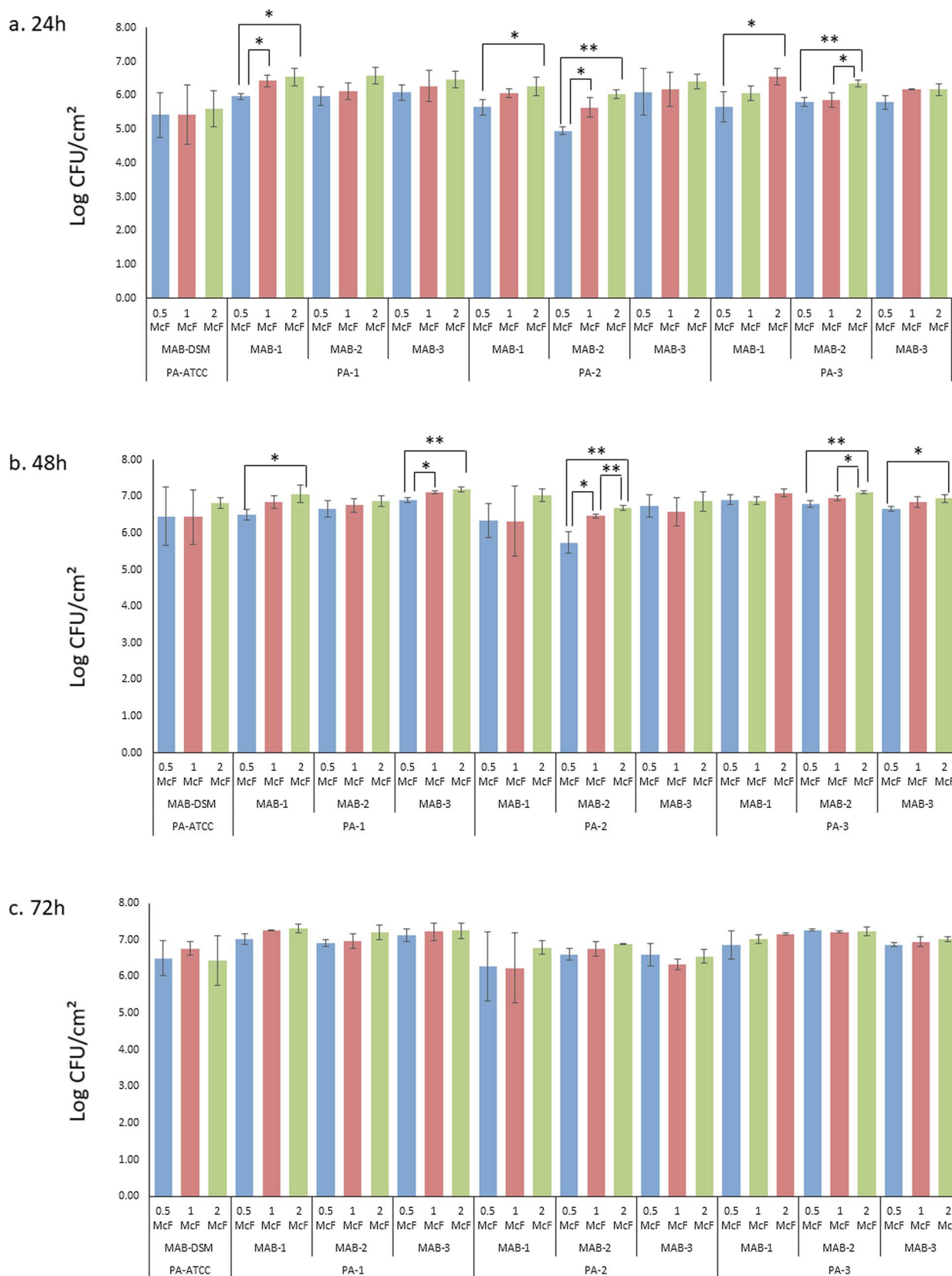


Fig. 3. Effect of *M. abscessus* inoculum on the log CFU/cm² of *M. abscessus* in dual species biofilms.

Effect of *M. abscessus* (MAB) initial concentration (1.5×10^8 , 3×10^8 or 6×10^8 CFU/mL) on *M. abscessus* number when developing dual species biofilms with *P. aeruginosa* (PA) at 24 (a), 48 (b) and 72 (c) hours. * Statistically significant: $p \leq 0.05$ ** Statistically significant: $p \leq 0.01$ (Data shown are average; $n \geq 3$; error bars indicate SD)

Table 1

Average number (log CFU/cm² ± SD) of *P. aeruginosa* in single species biofilms at 24, 48 and 72 h.

	PA-ATCC	PA-1	PA-2	PA-3
24h	9.21 ± 0.10	8.01 ± 0.35	5.75 ± 0.29	8.17 ± 0.18
48h	9.48 ± 0.09	8.57 ± 0.13	7.86 ± 0.02	8.38 ± 0.09
72h	9.49 ± 0.12	8.71 ± 0.18	7.47 ± 0.40	9.06 ± 0.14

Our objective is to study the influence of *P. aeruginosa* on *M. abscessus* biofilm formation at different time points (24, 48 and 72 h) and with different *M. abscessus* inoculums, and to determine the community structure. Once standardized this technique, further studies will be done to determine the role, if any, of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* interspecies interactions in susceptibility to antibiotics.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Two different types of strains were used: two reference strains, *M. abscessus* subsp. *abscessus* DSM 44196 (MAB-DSM) and *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PA-ATCC), and 3 clinical strains of each species. *P. aeruginosa* clinical strains (PA-1, PA-2 and PA-3) were isolated from respiratory samples of chronically infected CF patients. All of these strains presented a mucoid phenotype. *M. abscessus* subsp. *abscessus* (MAB-1, MAB-2) and *M. abscessus* subsp. *massiliense* (MAB-3) clinical strains were isolated from respiratory samples of patients with bronchiectasis (García-Pedrazuela et al., 2015). All of them presented a smooth colony phenotype and were clinically significant according to the ATS/IDSA guidelines (Griffith et al., 2007).

2.2. Ethics statement

All the clinical strains were collected from respiratory samples as part of diagnostic or routine procedures and were processed in the clinical microbiology department. The de-identified clinical strains used for this study did not require formal Human Ethics Committee approval or Informed Patient Consent.

2.3. Biofilm formation

P. aeruginosa and *M. abscessus* dual species biofilms were grown according to the method described by Anderl et al. (Anderl et al., 2000), with minor modifications. *P. aeruginosa* cultures were grown overnight in tryptic soy broth (TSB) at 37 °C, centrifuged 10 min at 3500 rpm,

Table 3

Average number (log CFU/cm² ± SD) of *M. abscessus* in single species biofilms at 24, 48 and 72 h with different inoculums.

	MAB-DSM	MAB-1	MAB-2	MAB-3
0.5 McF				
24h	6.05 ± 0.10	5.58 ± 0.48	6.09 ± 0.40	5.75 ± 0.53
48h	8.26 ± 0.23	7.50 ± 0.33	7.92 ± 0.14	8.13 ± 0.07
72h	9.11 ± 0.13	8.48 ± 0.28	8.60 ± 0.16	8.87 ± 0.12
1 McF				
24h	5.89 ± 0.20	6.26 ± 0.25	6.29 ± 0.33	6.58 ± 0.37
48h	8.40 ± 0.23	7.92 ± 0.15	8.12 ± 0.03	8.35 ± 0.28
72h	8.96 ± 0.35	8.72 ± 0.16	8.72 ± 0.08	8.85 ± 0.13
2 McF				
24h	6.32 ± 0.35	6.51 ± 0.49	6.37 ± 0.33	6.80 ± 0.40
48h	8.32 ± 0.26	7.99 ± 0.29	8.17 ± 0.18	8.48 ± 0.11
72h	9.14 ± 0.11	8.88 ± 0.17	8.68 ± 0.19	8.94 ± 0.13

washed three times with sterile phosphate buffer (PBS) and then diluted to a 0.5 MacFarland (McF) ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL). *M. abscessus* cultures were grown in tryptic soy agar supplemented with 5% sheep blood (TSS, bioMérieux[®]) for 72 h, and then suspended and diluted in PBS to obtain a 0.5 McF ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL), 1 McF ($\sim 3 \times 10^8$ CFU/mL) and 2 McF ($\sim 6 \times 10^8$ CFU/mL). Autoclaved (15 min, 121 °C), white, polycarbonate membranes (diameter, 13 mm; pore size 0.2 µm) were placed on TSS plates and inoculated with 2 µl of the 0.5 McF solution of *P. aeruginosa* together with 2 µl of each solution (0.5; 1 or 2 McF) of *M. abscessus*. Single species biofilms of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* were included for each condition. The plates were incubated at 37 °C, in a 5% CO₂ atmosphere, for 24, 48 or 72 h. The membrane-supported biofilms were transferred to fresh culture medium every 24 h. The dual species biofilms were formed with the reference strains (MAB-DSM/PA-ATCC) and with all the possible combinations of the clinical strains (MAB-1/PA-1, MAB-1/PA-2, MAB-1/PA-3, MAB-2/PA-1, MAB-2/PA-2, MAB-2/PA-3, MAB-3/PA-1, MAB-3/PA-2, MAB-3/PA-3).

2.4. Biofilm quantification

The biofilms were sampled at 24, 48, and 72 h. When sampled, each membrane-supported biofilm was placed in 10 ml of PBS, vortexed 30 s, sonicated for 2 min and vortexed again for 30 s. Culturable bacteria were quantified by drop plating serially diluted samples onto two selective media (MacConkey Agar and Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood, both from bioMérieux[®]). *P. aeruginosa* colonies were counted in MacConkey agar after 24 h of incubation, whereas *M. abscessus* colonies were counted in CNA agar after 72 h.

Table 2

Average number (log CFU/cm² ± SD) of *P. aeruginosa* in dual species biofilms at 24, 48 and 72 h with different *M. abscessus* inoculum suspensions. *Significantly different from single species biofilm ($p \leq 0.05$). **Significantly different from single species biofilm ($p \leq 0.01$).

	PA-ATCC	PA-1	PA-2	PA-3
	MAB-DSM	MAB-1	MAB-2	MAB-3
0.5 McF				
24h	9.15 ± 0.58	8.16 ± 0.26	8.32 ± 0.13	8.28 ± 0.15
48h	9.15 ± 0.25	8.86 ± 0.14	8.78 ± 0.29	8.71 ± 0.28
72h	8.77** ± 0.12	9.15* ± 0.17	9.08 ± 0.20	9.14* ± 0.18
1 McF				
24h	9.03 ± 0.56	8.08 ± 0.19	8.23 ± 0.16	8.25 ± 0.12
48h	9.08 ± 0.31	8.94* ± 0.16	8.94 ± 0.44	8.89 ± 0.13
72h	8.77** ± 0.09	9.12* ± 0.06	9.10 ± 0.28	9.22* ± 0.26
2 McF				
24h	9.16 ± 0.49	8.20 ± 0.43	8.50 ± 0.13	8.20 ± 0.19
48h	8.76** ± 0.21	8.95* ± 0.15	8.72 ± 0.35	8.81 ± 0.25
72h	8.62** ± 0.12	9.08* ± 0.09	9.03 ± 0.16	9.16* ± 0.17

Table 4
Average number (log CFU/cm² ± SD) of *M. abscessus* in dual species biofilms at 24, 48 and 72 h with different *M. abscessus* inoculum suspensions. *Significantly different from single species biofilm (p ≤ 0.05). **Significantly different from single species biofilm (p ≤ 0.01).

	MAB-1			MAB-2			MAB-3		
	PA-ATCC			PA-1			PA-1		
	PA-1	PA-2	PA-3	PA-1	PA-2	PA-3	PA-1	PA-2	PA-3
0.5 McF									
24h	5.43 ± 0.66	5.65 ± 0.23	5.67 ± 0.45	5.98 ± 0.28	4.95** ± 0.12	5.81 ± 0.13	6.08 ± 0.23	6.11 ± 0.69	5.80 ± 0.20
48h	6.46* ± 0.80	6.34* ± 0.48	6.92* ± 0.13	6.68* ± 0.22	5.75** ± 0.30	6.80** ± 0.10	6.91** ± 0.07	6.75** ± 0.30	6.68** ± 0.06
72h	6.50** ± 0.47	6.29* ± 0.95	6.88** ± 0.39	6.92** ± 0.09	6.61** ± 0.16	7.28** ± 0.03	7.13** ± 0.17	6.60** ± 0.32	6.88** ± 0.05
1 McF									
24h	5.44 ± 0.88	6.06 ± 0.13	6.07 ± 0.22	6.13 ± 0.23	5.64 ± 0.29	5.87 ± 0.22	6.28 ± 0.46	6.19 ± 0.51	6.18 ± 0.02
48h	6.44* ± 0.74	6.33* ± 0.96	6.89** ± 0.12	6.76** ± 0.18	6.47** ± 0.05	6.96** ± 0.07	7.13* ± 0.05	6.59** ± 0.37	6.85** ± 0.14
72h	6.77** ± 0.19	6.24* ± 0.95	7.03** ± 0.12	6.98** ± 0.20	6.75** ± 0.20	7.22** ± 0.02	7.23** ± 0.23	6.34** ± 0.14	6.96** ± 0.12
2 McF									
24h	5.61 ± 0.52	6.26 ± 0.28	6.56 ± 0.24	6.59 ± 0.25	6.03 ± 0.13	6.35 ± 0.10	6.47 ± 0.23	6.42 ± 0.22	6.17 ± 0.17
48h	6.84** ± 0.15	7.04** ± 0.17	7.10** ± 0.11	6.88** ± 0.15	6.69** ± 0.06	7.13** ± 0.03	7.20** ± 0.08	6.87** ± 0.27	6.95** ± 0.10
72h	6.44** ± 0.68	6.80** ± 0.20	7.16** ± 0.03	7.21** ± 0.19	6.90** ± 0.02	7.24** ± 0.11	7.25** ± 0.22	6.56** ± 0.19	7.03** ± 0.06

2.5. Microscopic analysis of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* dual species biofilms

Black, polycarbonate membranes (diameter, 25 mm; pore size 0.2 µm) were inoculated with *P. aeruginosa* and *M. abscessus* (MAB-DSM/PA-ATCC) in a proportion 1:1 and incubated for 24 h. Then, two different microscopic techniques were employed in order to study the spatial distribution of the biofilms: a histologic-based microscopic study and confocal scanning laser microscopy (CSLM). For the histologic-based microscopic study, dual species colony-biofilms were immersed in Richard-Allan Scientific™ Neg-50™ Frozen section medium (Thermo Scientific, USA) and frozen in liquid nitrogen. Longitudinal sections of 20 µm were made using a cryostat at −20 °C and placed on Superfrost™ Plus microscope slides (Thermo Scientific, USA). The samples were then fixed with methanol, stained using Ziehl-Neelsen (ZN) stain to differentiate *M. abscessus* (ZN positive) and *P. aeruginosa* (ZN negative), and studied using light microscopy imaging. For CSLM, dual species colony-biofilms were frozen at −80 °C for 30 min and fixed using 4 °C-tempered Formalin 10%, neutral buffered, Wintergreen Scented solution (Sigma-Aldrich, USA) for 3 h. Then, biofilms were stained using: (1) Auramine-rhodamine to visualize acid-fast organisms (*M. abscessus*) and disrupt the membranes of non-acid-fast organisms (*P. aeruginosa*), and (2) Propidium iodide (Applied biosystems, Thermofisher, USA), which binds to DNA of non-viable cells, to visualize *P. aeruginosa*. After staining, the biofilms were placed on a 35 mm glass bottom µ-dish (Ibidi, Martinsried, Germany) and analyzed using a Leica DM IRB confocal laser-scanning microscope (Leica, Germany).

2.6. Proof of concept: biofilm eradication with clarithromycin

The biofilms were exposed to antibiotic treatment according to the method described by Anderl et al. (Anderl et al., 2000). Briefly, biofilms were grown on polycarbonate membranes with reference (PA-ATCC, MAB-DSM) and clinical (MAB-3, PA-1) strains of *P. aeruginosa* and *M. abscessus*, alone and combined in a proportion 1:1. After 24 (i.e., young biofilms) or 72 h (i.e., mature biofilms) of incubation, biofilms were transferred to Antibiotic Medium 2 agar (BD Difco™) without antibiotic or supplemented with clarithromycin at a concentration of 10x *M. abscessus* MIC (Cla, 0.3 µg/mL). Biofilm quantification was carried out after 24 h of treatment. Log eradication was calculated by subtracting the log surviving bacteria after treatment from the corresponding log control bacteria.

2.7. Statistical analysis

All the experiments were performed at least in biological triplicate. The normal distribution of the data was assessed using the Shapiro-Wilk test. The means of the log CFU/cm² for each experiment were compared with an ANOVA test when the number of conditions was more than two. If the comparison was made between two conditions, then an independent-sample *t*-test was performed. Statistical significance was considered when *p*-value was less than or equal to 0.05.

3. Results

3.1. Comparison of *M. abscessus* growth in general and selective media

Before making the study, the recovery of *M. abscessus* in non-selective (TSS) and selective media (CNA agar) was compared. For that purpose, a 0.5 McF suspension of *M. abscessus* DSM 44196 was used and serial dilutions were made to calculate the CFU/mL in each media. The results showed that the percentage of recovery in CNA following 72 h of incubation was 99.7% when compared to the recovery in TSS.

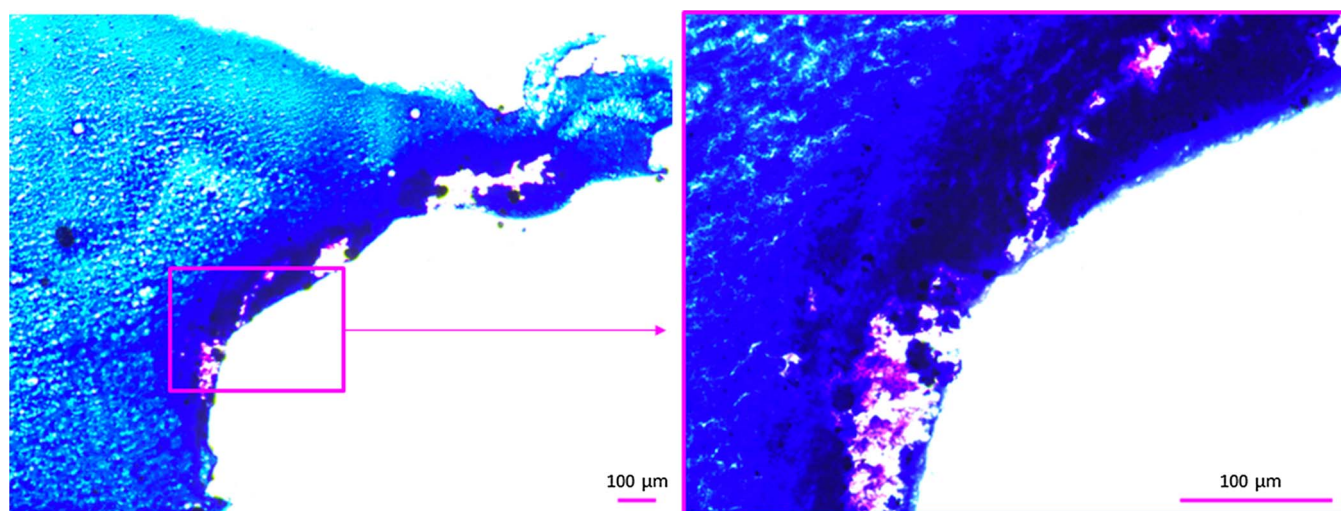


Fig. 4. Internal structure of a *P. aeruginosa* and *M. abscessus* dual species biofilm.

In the left, an image of a longitudinal section of the dual species biofilm is presented at a magnification of 50x, where the layered structure of the community can be observed. Microcolonies of *M. abscessus* (pink) were mostly restricted to the inner zone of the biofilm, just above the membrane, while *P. aeruginosa* (blue) grew abundantly towards the upper layers. In the right image, a more detailed view (200 ×) of the structure is shown. For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

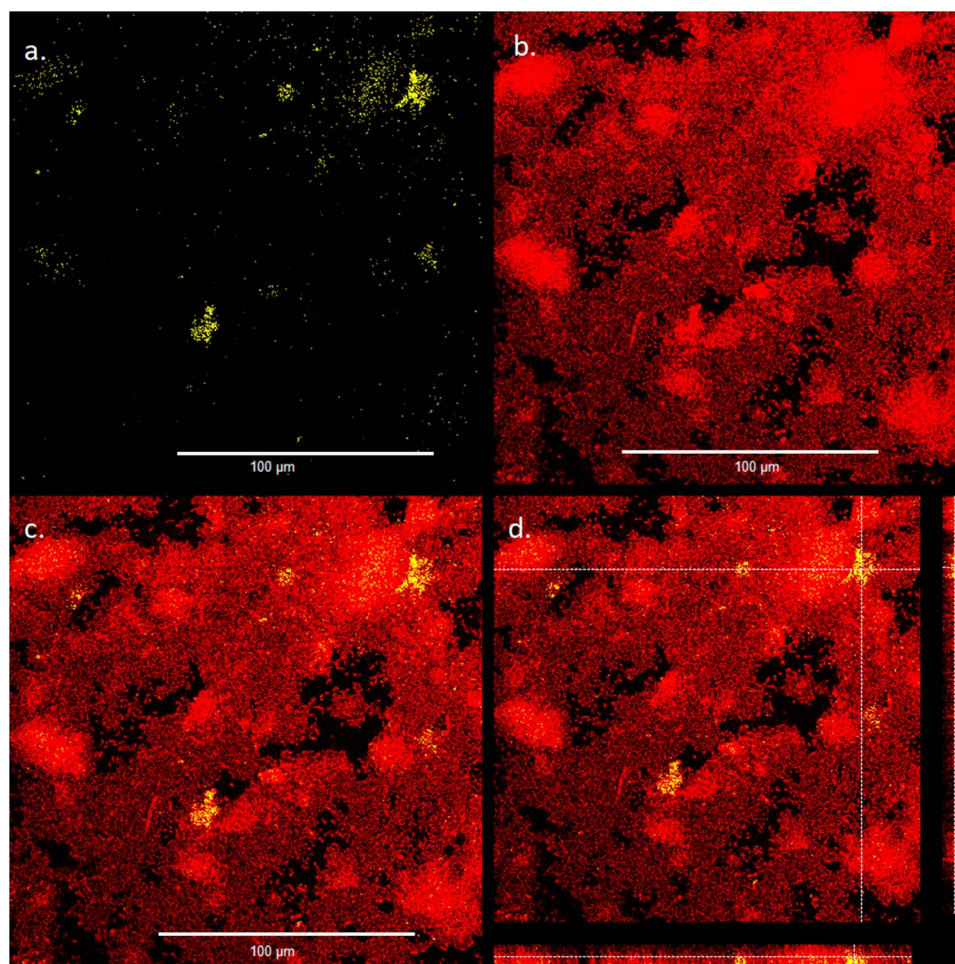
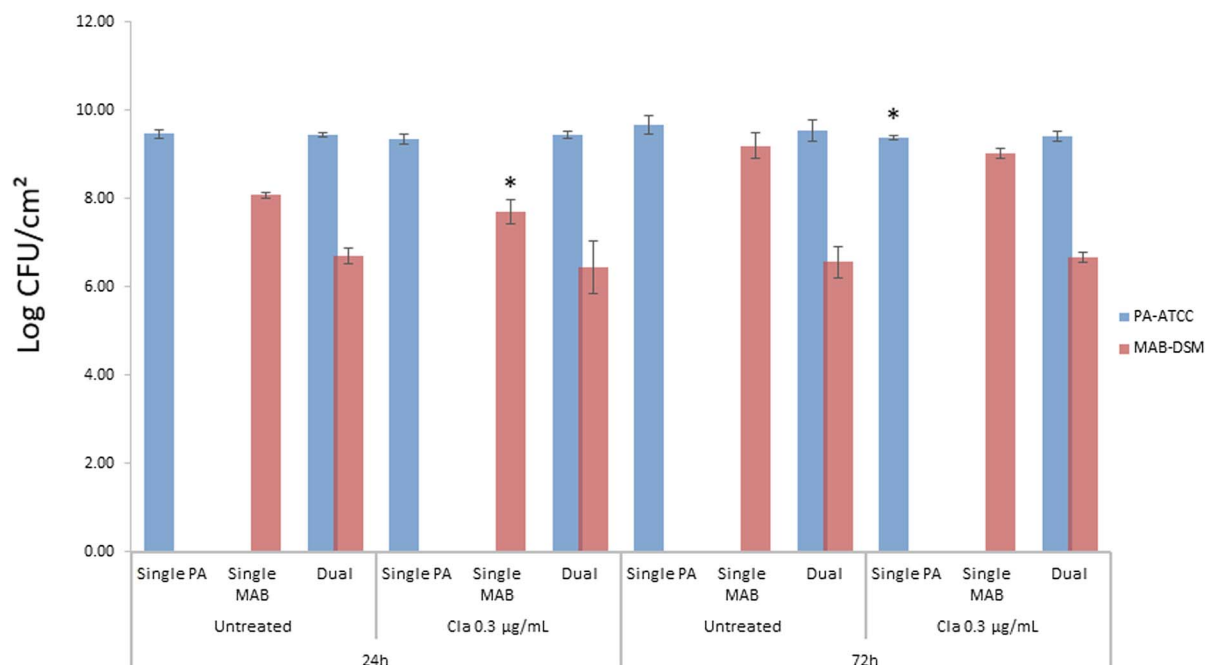


Fig. 5. Confocal scanning laser microscopy of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* dual species biofilms.

24 h grown *M. abscessus* and *P. aeruginosa* dual species biofilms were observed using CLSM with a 40x oil objective. In the image, microcolonies of *M. abscessus* (a, yellow cells) are covered by *P. aeruginosa* (b, red cells). A combination of both images (c) is shown. Picture d shows both a vertical (down) and horizontal (right) profile view of a *M. abscessus* microcolony (signaled) surrounded by *P. aeruginosa* cells.

a. Reference strains



b. Clinical strains

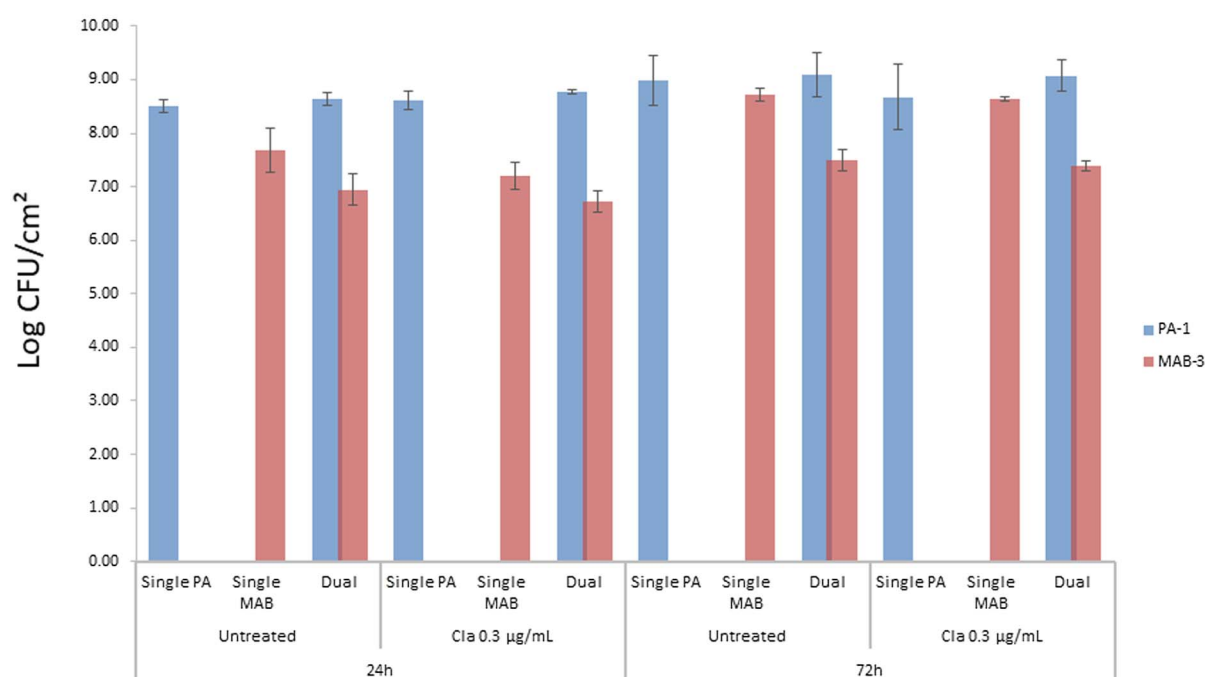


Fig. 6. Eradication of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* single and dual species biofilms with clarithromycin.

Eradiation of biofilm formation was assessed based on the number of bacteria grown on the membranes in single and dual cultures of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* MAB-DSM/PA-ATCC (a) and MAB-3/PA-1 (b) in the presence or absence of clarithromycin (cla), * $p \leq 0.05$ when comparing a treated organism to its control without antibiotic (Data shown are average; $n \geq 3$; error bars indicate SD).

3.2. Influence of time on dual species biofilm formation

An increase on *M. abscessus* and *P. aeruginosa* log CFU/cm² in dual species biofilms was observed after increasing time elapsed of biofilm formation at all the ratios tested. The results together with the statistical significance are summarized in Fig. 1, while the macroscopic

evolution of the dual species biofilms together with the changes in community composition over time is shown on Fig. 2.

Statistically significant differences were appreciated when the log CFU/cm² of *M. abscessus* in dual species biofilms was compared between different time points in all the combinations, except MAB-3/PA-2 at all the ratios tested ($p > 0.05$), and MAB-DSM/PA-ATCC and MAB-

1/PA-2 when the initial concentrations of *M. abscessus* were 1.5 and 3×10^8 CFU/mL ($p > 0.05$). Statistically significant differences were mainly found between 24 and 48 h and between 24 and 72 h ($p \leq 0.05$).

3.3. Influence of *M. abscessus* initial concentration on biofilm formation at different time points

M. abscessus single species biofilm formation was not influenced by the initial concentration of this organism at any time investigated (24, 48 and 72 h, $p > 0.05$). Nevertheless, changes in the inoculum of *M. abscessus* had a statistically significant impact on *M. abscessus* log CFU/cm² in dual species biofilms. The results together with the statistical significance are summarized in Fig. 3.

P. aeruginosa log CFU/cm² in dual species biofilms was only affected by the different inoculums of *M. abscessus* in the combination MAB-3/PS-2 at 24 h, showing a significant increase in its number when comparing the log CFU/cm² obtained between 1.5×10^8 and 3×10^8 CFU/mL ($p \leq 0.05$), and 3×10^8 and 6×10^8 CFU/mL ($p \leq 0.01$).

3.4. Comparison of single vs dual species biofilms

The log CFU/cm² of single and dual species biofilms of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* is shown on Tables 1–4.

At 24 h, there were differences in the number of bacteria in single compared to dual species biofilms in the combinations MAB-2/PA-2 and MAB-3/PA-2. In MAB-2/PA-2, *M. abscessus* reduced its number when developing a dual species biofilm with *P. aeruginosa* at a concentration of 1.5×10^8 CFU/mL ($p \leq 0.01$). Meanwhile, in MAB-3/PA-2, *P. aeruginosa* increased its number when grown with *M. abscessus* at any concentration ($p \leq 0.05$).

At 48 h, a reduction in the log CFU/cm² of *M. abscessus* was observed when developing dual species biofilms with *P. aeruginosa*, compared to its single species biofilms, at all the concentrations ($p \leq 0.05$). Significant differences between single and dual species biofilms of *P. aeruginosa* were also observed: *P. aeruginosa* increased its number when growing together with *M. abscessus* in the combinations MAB-1/PA-1 (concentrations 3×10^8 and 6×10^8 CFU/mL; $p \leq 0.05$), MAB-1/PA-3 (1.5×10^8 and 6×10^8 CFU/mL, $p \leq 0.05$), MAB-2/PA-3 (3×10^8 and 6×10^8 CFU/mL, $p \leq 0.01$) and MAB-3/PA-3 (6×10^8 CFU/mL, $p \leq 0.05$). In the combinations MAB-DSM/PA-ATCC and MAB-2/PA-2, *P. aeruginosa* reduced its number when growing in a biofilm with *M. abscessus* (6×10^8 and 3×10^8 CFU/mL, $p \leq 0.01$).

At 72 h, *M. abscessus* log CFU/cm² in dual species biofilms was reduced, compared to single species biofilms, at all the concentrations ($p \leq 0.01$). In the combinations MAB-1/PA-1, MAB-1/PA-3, MAB-2/PA-3 and MAB-3/PA-1, the log CFU/cm² of *P. aeruginosa* in dual species biofilms was higher than in single species biofilms ($p \leq 0.05$). However, in the study with the laboratory strains, a decrease of *P. aeruginosa* number in the dual species biofilm was seen at all ratios tested ($p \leq 0.01$).

3.5. Spatial organization of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* dual species biofilms

In order to have a better understanding of both the community structure and the colony-biofilm architecture, CSLM and histologic-based microscopic studies were carried out. The internal architecture of the dual species biofilm is shown on Fig. 4, where a longitudinal section of the biofilm was studied. The biofilm structure was characterized by a stratified pattern, in which *M. abscessus* growth was mostly restricted to the inner zone of the biofilm, while *P. aeruginosa* grew abundantly in the upper layers. Between both differentiated regions a dark blue zone, in which both species coexisted, was present. Also, some microcolonies of *M. abscessus* could be located in the upper regions of the biofilm. Taking a closer look to the spatial distribution of the community with

CSLM (Fig. 5), it was found that *M. abscessus* within the biofilm was aggregated forming clusters, surrounded by *P. aeruginosa*.

3.6. Proof of concept: biofilm eradication with clarithromycin

Young (24 h) and mature (72 h) single and dual species biofilms of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* were exposed to treatment with clarithromycin for 24 h (Fig. 6.). The results showed a statistically significant decrease in young *M. abscessus* (MAB-DSM) single species biofilms after the treatment (0.39 ± 0.13 , $p \leq 0.05$), compared to its untreated control. Mature *P. aeruginosa* (PA-ATCC) single species biofilms were also significantly affected by the treatment (0.35 ± 0.12 , $p \leq 0.05$). When the log eradication of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* was compared in single vs dual species biofilms, no differences could be found (data not shown).

4. Discussion

Lung infection is the main cause of morbidity and mortality in the CF patient. The increased viscosity of mucus and reduced clearance of potential pathogens predispose patients with CF to infections mediated by biofilms. Nowadays we are aware that these infections are mostly polymicrobial and they influence phenotypic characteristics of individual bacteria, including the response to antibiotic therapy (Lopes et al., 2012; Tavernier et al., 2017; Vandeplasseche et al., 2017).

In the present study, a demonstration *in vitro* of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* coexisting in a biofilm was made using a model that mimics *in vivo* biofilm formation (Singla et al., 2014). The increasing initial concentration of *M. abscessus* employed to develop the dual species biofilms had an effect on its population only at 24 and 48 h. Meanwhile, the recovery of *P. aeruginosa* from dual species biofilms was not affected by the different ratios used of *M. abscessus*, except in one case (MAB-3/PA-2) at 24 h. Time elapsed increased the presence of both species in the dual species biofilm, especially between 24 and 48 h. Indeed, the relative species distribution in the community remained stable from 48 to 72 h of biofilm formation in most of the combinations.

In our model, the population of *P. aeruginosa* in dual species biofilms was higher than *M. abscessus* at all the times and ratios examined, probably due to its higher growth rate (Yang et al., 2008). This situation in which the fast-growing organism becomes the dominant species in coexistence with the slower-growing one, which is nevertheless established within the biofilm and continues to increase in numbers over time, has previously been described (Banks and Bryers 1991).

This study also found a significant difference in mycobacterial population in single compared to dual species biofilms after 24 h in all the combinations, suggesting that *P. aeruginosa* has a competitive advantage over *M. abscessus*. The microscopic analysis of the spatial distribution of the species in dual species biofilms showed that both microorganisms were co-aggregated in a layered structure, where *P. aeruginosa* was found in the upper layers and *M. abscessus* in lower layers of the biofilm. This can be explained by the ability of *P. aeruginosa* to spread over the surface by means of organelles-mediated motility, which can outcompete the immobile *M. abscessus* bacteria (Elias and Banin 2012; Moons et al., 2009). This phenomenon, known as “layering” or “blanketing”, has previously been described in a *P. aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* dual species biofilm model (An et al., 2006).

Taking into account these results, we suggest that a 72 h growth of the mixed microbial culture at a ratio 1:1 would be the conditions to produce a mature *M. abscessus*-*P. aeruginosa* dual biofilm, in which all the interactions between the species are established and the relative species distribution is stable.

With that information, young (24 h) and mature (72 h) dual species biofilms were exposed to treatment with clarithromycin, the only oral antibiotic with consistent *in vitro* activity against *M. abscessus* (Jeon et al., 2009; Lee et al., 2015; Nessar et al., 2012). We found that single

species biofilms of both *P. aeruginosa* and *M. abscessus* reference strains reduced significantly its number when exposed to the treatment at 72 h and 24 h of biofilm maturation, respectively. Dual species biofilms were not affected by the treatment, although no significant difference was found when the Log eradication of dual vs single species biofilms was compared, suggesting that *P. aeruginosa* does not influence *M. abscessus* susceptibility to clarithromycin. Until now, *M. abscessus* biofilm susceptibility to antibiotics had only been described in single species biofilms (Flores et al., 2016; Greendyke and Byrd 2008; Ortiz-Perez et al., 2011).

Additionally, a screening of NTM in routine respiratory samples is recommended annually in individuals with a stable clinical course (Floto et al., 2016). Owing to the high rate of mycobacterial culture specimens contaminated with *P. aeruginosa* after the samples are decontaminated using the standard *N*-acetyl L-cysteine (0.5%)-NaOH (2%) method, some authors recommend re-treating the respiratory samples with 5% oxalic acid or with 1% chlorhexidine (Buijtelts and Petit 2005; Ferroni et al., 2006; Oliver et al., 2001). In this study, CNA agar was successfully used as a selective medium for the recovery of *M. abscessus* when growing together with *P. aeruginosa*. With this medium, the recovery of *M. abscessus* was nearly 100% when compared with TSS, and the growth of *P. aeruginosa* was completely inhibited, as it is a gram positive selective media. Thus, further studies with respiratory samples, adding CNA agar after the samples are decontaminated using the standard method, could be performed to determine CNA agar efficacy in culture-based detection of NTM in CF individuals.

5. Conclusion

M. abscessus is an intrinsically antibiotic-resistant NTM that is an emerging pathogen in CF. Although *M. abscessus* might be producing multispecies biofilms in the airways of CF patients, no studies were available in the literature. We developed a simple model with potential applications to test antibiotic susceptibility *in vitro* in biofilms of *M. abscessus* when growing together with a major CF pathogen, *P. aeruginosa*. In the present study, a demonstration *in vitro* of both species co-existing in a dual species biofilm was made, and 72 h growth of the mixed microbial culture at a ratio 1:1 were established as the conditions to produce a mature *M. abscessus* and *P. aeruginosa* dual species biofilm. A significant decrease in mycobacterial population in dual compared to single species biofilms was found, suggesting that *P. aeruginosa* outcompetes *M. abscessus*. We also found that *P. aeruginosa* does not influence *M. abscessus* susceptibility to clarithromycin, which indeed showed no efficacy against dual biofilms. Additionally, we indicate that CNA agar might be a suitable media to improve culture-based diagnosis of *M. abscessus* in CF, although further studies are needed in a clinical context.

Acknowledgments

This work was funded by the Ministry of Economy and Competitiveness (Grant MAT2013-48224-C2-2-R). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Part of this work has been reported at the 25th ECCMID (2015, Copenhagen). *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains were kindly provided by the Cystic Fibrosis Unit of La Paz Hospital (Madrid).

References

- An, D., et al., 2006. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (10), 3828–3833.
- Anderl, J.N., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (7), 1818–1824.
- Banks, M.K., Bryers, J.D., 1991. Bacterial species dominance within a binary culture biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (7), 1974–1979.
- Bedrossian, C.W., et al., 1976. The lung in cystic fibrosis. A quantitative study including prevalence of pathologic findings among different age groups. *Hum. Pathol.* 7 (2), 195–204.
- Bhagirath, A.Y., et al., 2016. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm. Med.* 16 (1), 174.
- Binder, A.M., et al., 2013. Epidemiology of nontuberculous mycobacterial infections and associated chronic macrolide use among persons with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188 (7), 807–812.
- Buijtelts, P.C., Petit, P.L., 2005. Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J. Microbiol. Methods* 62 (1), 83–88.
- Burmölle, M., et al., 2010. Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59 (3), 324–336.
- Burmölle, M., et al., 2014. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends Microbiol.* 22 (2), 84–91.
- Davies, J.C., Alton, E.W., Bush, A., 2007. Cystic fibrosis. *BMJ* 335 (7632), 1255–1259.
- DeBel, A., et al., 2013. Sampling and decontamination method for culture of non-tuberculous mycobacteria in respiratory samples of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 51 (12), 4204–4206.
- Elias, S., Banin, E., 2012. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* 36 (5), 990–1004.
- Esther Jr., C.R., et al., 2005. Nontuberculous mycobacterial infection in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 40 (1), 39–44.
- Esther Jr., C.R., et al., 2010. Chronic *Mycobacterium abscessus* infection and lung function decline in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 9 (2), 117–123.
- Ferroni, A., et al., 2006. Value of the chlorhexidine decontamination method for recovery of nontuberculous mycobacteria from sputum samples of patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 44 (6), 2237–2239.
- Flores, V.D., et al., 2016. Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis. *Microb. Pathog.* 99, 229–235.
- Floto, R.A., et al., 2016. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax* 71 (Suppl. 1), i1–i22.
- García-Pedrazuela, M., et al., 2015. Polyclonality among clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria: phenotypic and genotypic differences and their potential implications. *Clin. Microbiol. Infect.* 21 (4) 348 e1–348 e4.
- Greendyke, R., Byrd, T.F., 2008. Differential antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (6), 2019–2026.
- Griffith, D.E., et al., 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175 (4), 367–416.
- Jeon, K., et al., 2009. Antibiotic treatment of *Mycobacterium abscessus* lung disease: a retrospective analysis of 65 patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180 (9), 896–902.
- Koh, W.J., et al., 2017. Mycobacterial Characteristics and Treatment Outcomes in *Mycobacterium abscessus* Lung Disease. *Clin. Infect. Dis.* 64 (3), 309–316.
- Lee, M.R., et al., 2015. *Mycobacterium abscessus* complex infections in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 21 (9), 1638–1646.
- Levy, I., et al., 2008. Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel. *Emerg. Infect. Dis.* 14 (3), 378–384.
- Lopes, S.P., et al., 2012. Antibiotic resistance of mixed biofilms in cystic fibrosis: impact of emerging microorganisms on treatment of infection. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40 (3), 260–263.
- Melloul, E., et al., 2016. Characteristics of *aspergillus fumigatus* in association with *stentrophomonas maltophilia* in an *In vitro* model of mixed biofilm. *PLoS One* 11 (11), e0166325.
- Moons, P., Michiels, C.W., Aertsen, A., 2009. 'Bacterial interactions in biofilms'. *Crit. Rev. Microbiol.* 35 (3), 157–168.
- Nagano, H., et al., 2017. Causative species of nontuberculous mycobacterial lung disease and comparative investigation on clinical features of *Mycobacterium abscessus* complex disease: a retrospective analysis for two major hospitals in a subtropical region of Japan. *PLoS One* 12 (10), e0186826.
- Nessar, R., et al., 2012. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (4), 810–818.
- Oliver, A., et al., 2001. Nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis.* 32 (9), 1298–1303.
- Ortiz-Perez, A., et al., 2011. Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin ciprofloxacin and clarithromycin. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 29 (2), 79–84.
- Peters, B.M., et al., 2012. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 25 (1), 193–213.
- Prevots, D.R., Marras, T.K., 2015. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin. Chest Med.* 36 (1), 13–34.
- Qvist, T., et al., 2015. Chronic pulmonary disease with *Mycobacterium abscessus* complex is a biofilm infection. *Eur. Respir. J.* 46 (6), 1823–1826.
- Qvist, T., et al., 2016. Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 15 (3), 380–385.
- Robinson, M., Bye, P.T., 2002. Mucociliary clearance in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 33 (4), 293–306.
- Sibley, C.D., Surette, M.G., 2011. The polymicrobial nature of airway infections in cystic fibrosis: cangene Gold Medal Lecture. *Can. J. Microbiol.* 57 (2), 69–77.
- Singla, S., Harjai, K., Chhibber, S., 2014. Artificial *Klebsiella pneumoniae* biofilm model

- mimicking in vivo system: altered morphological characteristics and antibiotic resistance. *J. Antibiot. (Tokyo)* 67 (4), 305–309.
- Stout, J.E., Koh, W.J., Yew, W.W., 2016. Update on pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria. *Int. J. Infect. Dis.* 45, 123–134.
- Tavernier, S., et al., 2017. Community composition determines activity of antibiotics against multispecies biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 (9).
- Vandeplassche, E., Coenye, T., Crabbe, A., 2017. Developing selective media for quantification of multispecies biofilms following antibiotic treatment. *PLoS One* 12 (11), e0187540.
- Viviani, L., et al., 2016. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria (NTM) amongst individuals with cystic fibrosis (CF). *J. Cyst. Fibros.* 15 (5), 619–623.
- Waters, V., Ratjen, F., 2016. Antibiotic treatment for nontuberculous mycobacteria lung infection in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 12 CD010004.
- Whittier, S., et al., 1993. Improved recovery of mycobacteria from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 31 (4), 861–864.
- Yang, L., et al., 2008. 'In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections'. *J. Bacteriol.* 190 (8), 2767–2776.

Sol–Gel-Deposited Ti-Doped ZnO: Toward Cell Fouling Transparent Conductive Oxides

Rehab Ramadan,^{†,‡} David Romera,[§] Rosalía Delgado Carrascón,[†] Miguel Cantero,[⊥] John-Jairo Aguilera-Correa,[§] Josefa P. García Ruiz,^{||} Jaime Esteban,[§] and Miguel Manso Silván^{*,†}

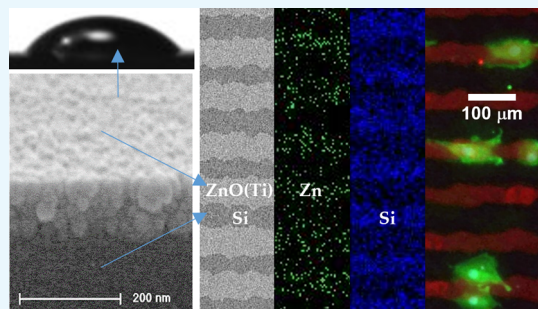
[†]Departamento de Física Aplicada and Instituto de Ciencia de Materiales Nicolás Cabrera, ^{||}Departamento de Biología Molecular, and [⊥]Departamento de Física de la Materia Condensada and Instituto de Ciencia de Materiales Nicolás Cabrera, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

[‡]Physics Department, Faculty of Science, Minia University, 61519 Minia, Egypt

[§]Departamento de Microbiología Clínica, Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz, Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Ti-doped ZnO thin films were obtained with the aim of tailoring ZnO film bioadhesiveness and making the optoelectronic properties of ZnO materials transferable to biological environments. The films were prepared on silicon substrates by sol–gel spin-coating and subsequent annealing. A Ti–O segregation limits the ZnO crystallite growth and creates a buffer out-layer. Consequently, the Ti-doped ZnO presents slightly increased resistivity, which remains in the order of $10^{-3} \Omega\cdot\text{cm}$. The strong biochemical interference of Zn^{2+} ions released from pure ZnO surfaces was evidenced by culturing *Staphylococcus epidermidis* with and without the Zn^{2+} coupling agent clioquinol. The Ti-doped ZnO surfaces showed a considerable increase of bacterial viability with respect to pure ZnO. Cell adhesion was assayed with human mesenchymal stem cells (hMSCs). Although hMSCs find difficulties to adhere to the pure ZnO surface, they progressively expand on the surface of ZnO when the Ti doping is increased. A preliminary microdevice has been built on the Si substrate with a ZnO film doped with 5% Ti. A one-dimensional micropattern with a zigzag structure shows the preference of hMSCs for adhesion on Ti-doped ZnO with respect to Si. The induced contrast of surface tension further induces a cell polarization effect on hMSCs. It is suggested that the presence of Ti–O covalent bonding on the doped surfaces provides a much more stable ground for bioadhesion. Such fouling behavior suggests an influence of Ti doping on film bioadhesiveness and sets the starting point for the selection of optimal materials for implantable optoelectronic devices.



1. INTRODUCTION

The long trajectory of ZnO within advanced sensing and actuating structures and the oligomineral nature of the degradation product Zn^{2+} invites to applications of this material in implantable devices.¹ In fact, this material is known for its versatile properties (photostable, nontoxic, inexpensive, and abundant).² In appropriate conditions, ZnO is a transparent semiconductor presenting high conductivity with a wide spectrum of optoelectronic applications (light-emitting diodes, photodetectors, or photovoltaic cells) in which ZnO is used mostly as a transparent conductive oxide (TCO).^{3,4} ZnO doping with Al, Ga, In, Ti, Zr, and B^{5–8} has been studied to improve the ZnO performance as a TCO. Very often, the doping strategies seek high electron mobilities to provide alternative materials to In:SnO₂ (ITO).⁹ Alternatively to doping, the formation of nanocomposites allows establishing a dual electronic and optical role to ZnO-based films.¹⁰

The advances in nanotechnology are expanding the applications of ZnO to the biomedical field. Doping ZnO

with different elements is in fact useful for cellular imaging.¹¹ ZnO photoluminescent nanoparticles can be doped with Co, Cu, or Ni and stabilized in aqueous colloidal solutions.¹² Relevantly, selected ZnO nanoparticles are able to penetrate into the cell nucleus, which opens imaging possibilities and potential genotoxic activity against cancer cells.¹³ Additionally, ZnO nanomaterials are being employed in the development of drug delivery systems exploiting engineered surface chemistry and large surface areas.¹⁴ Especially, ZnO has excellent properties for biosensing, such as strong adsorption capability and high isoelectric point, which allow detection of the adsorption of certain proteins, enzymes, and antibodies.¹⁵ The synthesis of ZnO nanostructures opens its use to nonenzymatic biosensor systems¹⁶ and self-powered nanosensors.¹⁷ In other applications, ZnO nanowires have been exploited as bio-

Received: March 8, 2019

Accepted: May 17, 2019

Published: July 1, 2019

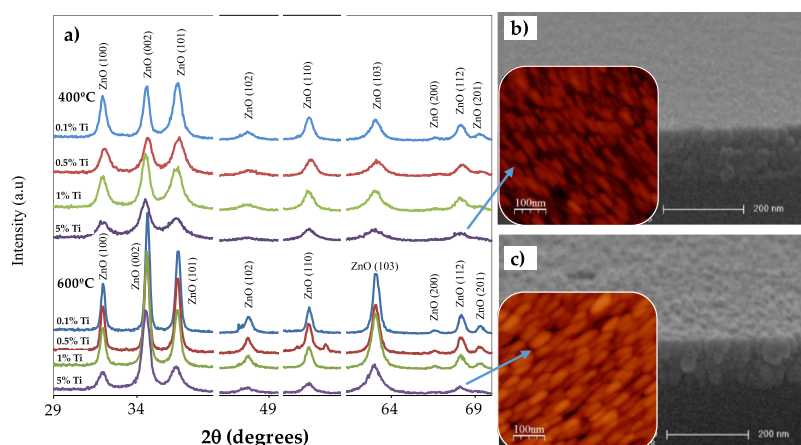


Figure 1. (a) X-ray diffractograms for ZnO:Ti films with doping levels of 0.1, 0.5, 1, and 5% Ti with respect to Zn (from top to bottom) annealed at 400 °C (top set) and 600 °C (bottom set). Miller indices according to the ZnO wurtzite phase. FE-SEM perspective view micrographs and AFM 500 × 500 nm² topography images (insets) of ZnO samples with 5% Ti after annealing at 400 (b) and 600 °C (c) (the z-scale in the AFM images is 25 nm).

medical piezoelectric devices. However, the biomedical applications of ZnO are drastically limited by its intrinsic solubility, which shortens the stability and lifetime of devices in cell culture conditions.^{18,19}

Outstandingly, the previously mentioned use of ZnO structures for self-powering devices extends the use of ZnO out of the biomedical context to the emerging field of bio-based power sources and artificial leaves. In fact, the role of TCOs in biophotovoltaic systems has been already put in relevance underlining the complexity for separation of photogenerated centers after surface immobilization.²⁰ Relevantly, a configuration of ZnO nanowires has already been proposed in a “bio-hybrid solar cell”.²¹ All these reports point to an increasing demand of ZnO-based TCOs in biological environments and to the need of a prospective materials research in bioengineered TCOs.

In this paper, we propose the synthesis of Ti-doped ZnO thin films with different Ti contents in order to regulate the surface bioadhesiveness *in vitro*. Ti oxides present a covalent character that can be used to compensate the strong ionic character of ZnO and compensate its exacerbated solubility in alkaline solutions at 37 °C. We propose that this process can be used to tune its physical properties and most relevantly its biofouling properties. The effects of Ti doping on the microstructure, surface properties, and conductivity of the films are studied in detail prior to the *in vitro* analysis of the bioadhesiveness of the surfaces at the bacterial and human cell level. To evaluate their potential for integration in biomedical devices, a microdevice application is demonstrated by applying a photolithographic sequence to selected Ti-doped ZnO films and observing the response of human mesenchymal stem cells (hMSCs).

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Microstructural Characterization. The ZnO thin films with different annealing treatments (400 and 600 °C) and Ti doping levels (from 0.1 to 5% Ti) were analyzed by X-ray diffraction (XRD). The corresponding diffractograms are presented in Figure 1a. The samples were all polycrystalline independently of the annealing temperature and doping level. All the samples fitted well the wurtzite structure, labeled with appropriate Miller indices on the diffractogram. It could be

observed that the increase of the annealing temperature has a positive effect on the growth of crystallite size, with higher intensity/width ratios for the diffraction peaks in the 600 °C annealed sample, at an equivalent doping level.

In fact, it is significant that all the ZnO:Ti thin films which have been annealed at 600 °C exhibit a dominant (002) peak, although according to the reference diffraction patterns, the (101) plane should be the most intense. Consequently, (002) appears as a preferential direction of growth and orientation of ZnO thin films. High temperatures of 600 °C further favor this preferential growth.

The best defined diffraction peaks of hexagonal ZnO correspond to the lowest Ti doping levels of 0.1%. In fact, as the Ti content increases, the diffraction peaks loose resolution and suffer a peak shift, as predicted by Vegard's law. Excess Ti induces point defects and consequently tensions within the ZnO structure in view of the coordination and lattice mismatch between the two potential final structures of a solid solution (considering wurtzite for ZnO and anatase for TiO₂). The increase of Ti % also affects the preferential growth along (002). Although low Ti % leads to a clear preferential growth [note relative intensities of (002) and (100) peaks of 4:1 for 0.1% Ti sample], this effect is drastically reduced after Ti enrichment [intensities of (002) and (100) peaks of 7:3 for 5% Ti sample].

The effect of Ti doping level and annealing temperature had a direct effect in the average crystallite size considering the preferential growth direction, as calculated by applying a Lorentzian fitting to the (002) peak and using the best fit parameters into Scherrer's formula.²² Figure S1 reveals that the mean crystallite size in the (002) preferential direction remains within the 10–40 nm range and decreases when the amount of Ti increases in the sample. Additionally, it increases with the annealing temperature of the samples.

Relevantly, this microstructural effect of doping and annealing also influences the final surface topography of the film. Figure 1b,c corresponds to field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) cross-sectional micrographs and atomic force microscopy (AFM) surface topography images from the surfaces of ZnO doped with 5% Ti annealed at 400 and 600 °C, respectively. The films reach an overall thickness of 180 and 160 nm for 400 and 600 °C annealing,

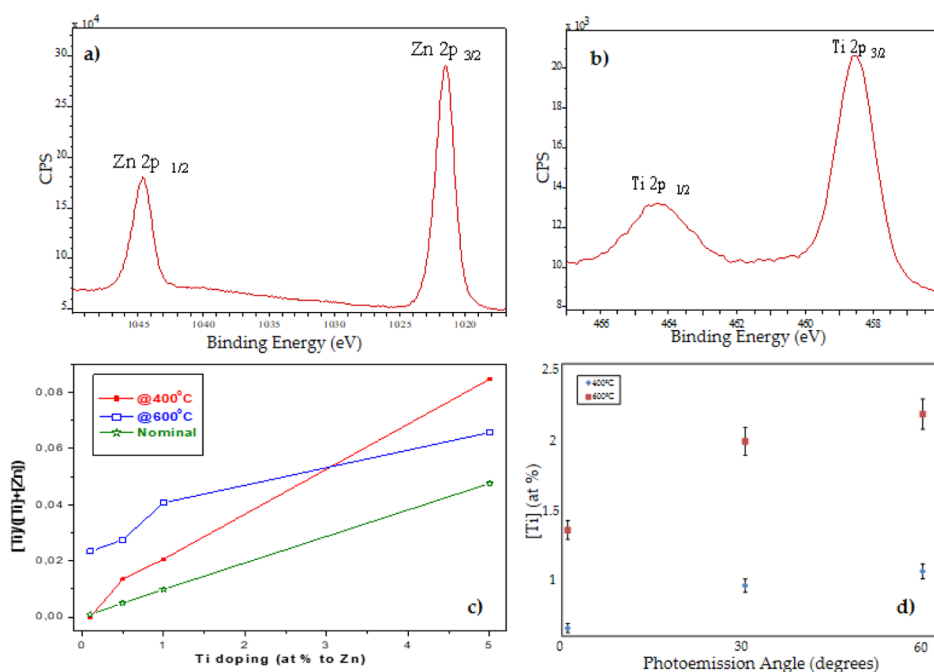


Figure 2. Characteristic Zn 2p (a) and Ti 2p (b) core-level XPS spectra of 5% Ti-doped ZnO sample annealed at 600 °C. (c) Normalized [Ti]/([Ti] + [Zn]) ratio calculated from the survey spectra of the ZnO samples doped at 0.1, 0.5, 1, and 5% Ti after 400 and 600 °C annealing compared with the nominal expected value (lines indicate exclusively trends). (d) Variation of Ti at. % for increasing photoemission angle for samples doped at 5% at 400 and 600 °C.

respectively, which confirms the continuous condensation effect of annealing temperature on sol–gel-deposited films. It can be noted that the mean grain size is in the same order of magnitude as the crystallite size estimated by XRD (ca. 15 and 50 nm for 400 and 600 °C annealing, respectively), confirming the effect of the annealing temperature on the microstructure. Additionally, the emphasized grain growth activated at 600 °C and the crystallite growth constrictions due to high doping level lead to an increasingly rough surface. Prominent grain heads emerge from the surface, leading to a pseudopyramidal profile. In fact, the root-mean-square roughness (R_{rms}) estimated from the AFM images clearly indicates a temperature activation of the roughness, with values of 1.2 ± 0.2 and 1.7 ± 0.1 nm for the ZnO:Ti 5% samples annealed at 400 and 600 °C, respectively. The complementary analysis of ZnO control samples further illustrated the temperature activation of the roughness. Remarkably, no significant differences were identified in the R_{rms} for films with common annealing temperature but differing in Ti doping (see Figure S2). With respect to the relevant microscopic information related to mechanics, the films show no surface-cracking and good interface adhesion, denoting the formation of a continuous relaxed film with no drastic tendency toward delamination.

2.2. Surface Composition and Wetting. Prior to a surface inspection, the in-depth analysis of the films was accomplished by Rutherford backscattering spectrometry (RBS) measurements in C resonant conditions. These analyses showed that the in-depth composition was relatively homogeneous, with some slight surface enrichment in Ti and with abundant C incorporation (ca. 10% for all the films), irrespective of the doping level of the films. Figure S3 details the experimental and analyzed spectra of ZnO:Ti 5% after annealing at 400 and 600 °C (left) and the derived in-depth analyses (right). In order to obtain a more resolved estimation of the surface composition on the top of the layers, XPS

spectra were obtained. The surfaces of ZnO:Ti thin films were composed of Zn, O, Ti, and C (plus a nonaccountable amount of H) with relative composition depending on the annealing temperature and doping level. Only the sample with a highest Ti doping level (5%) and annealed at a lower temperature (400 °C) presented a Cl residue below 1 at. %. In particular, there were no traces of Si, which confirms the conformal character of the coating on the substrate and the lack of substrate out-diffusion.

Relevantly, the chemical state of Zn and Ti was evaluated by obtaining the corresponding Zn 2p and Ti 2p core-level spectra. Figure 2a,b shows the Zn 2p and Ti 2p core-level spectra for the 5% Ti-doped ZnO surfaces after 600 °C annealing. The characteristic binding energies (BEs) of the peaks, with 3/2 splitting components at ca. 1021.5 and 458.5 eV, respectively, and their shape clearly illustrate that the chemical state corresponds to the oxidized Zn (Zn^{2+} state) and Ti (Ti^{4+} state), such as in well-formed ZnO and TiO_2 .^{23–25} The O 1s peak (not shown) can be consistently fitted by two components at 532.0 eV, which is attributed to oxygen in TiO_2 , and the one at 531.0 eV corresponding to oxygen in the ZnO structure.²⁷ The described BEs and peak ratios were common for all the analyzed ZnO:Ti samples at varying annealing temperature (400 vs 600 °C) and Ti concentration (from 0.1 to 5%).

Quantitative data obtained from the survey spectra were used to monitor the level of surface integration of Ti and Zn with respect to the nominal values used in the design of the synthesis. The results of $[\text{Ti}]/([\text{Ti}] + [\text{Zn}])$ are plotted in Figure 2b for the two annealing temperatures and a whole range of Ti doping to illustrate a clear enrichment of the surface in Ti with respect to the expected nominal value. This enrichment is generalized for all Ti doping levels and annealing temperatures (only the sample annealed at 400 °C at the lowest doping levels shows a value equal to the nominal one).

The origin of this surface enrichment can be due to both a preferential condensation of the Ti precursor during spin-coating because of the fast xerogel formation kinetics of the titanium precursor and a surface segregation of the minority element upon thermal annealing.

To further investigate this point, the surface composition was evaluated at two additional photoelectron take-off angles for the samples with the highest Ti doping level and both annealing temperatures. The results indicate an increase of Ti concentration at the increasing take-off angle, which is a clear indication of the surface segregation of Ti. Additionally, this segregation is more pronounced for the sample annealed at 600 °C, which confirms the critical role played by the annealing process in this segregation.

To understand the behavior of the surface of the ZnO films, the water contact angle (WCA) was evaluated at different doping conditions and annealing temperatures. All the surfaces exhibited a mild hydrophilic character with WCA values ranging from 55 to 85°, as illustrated in Figure 3. The effect of

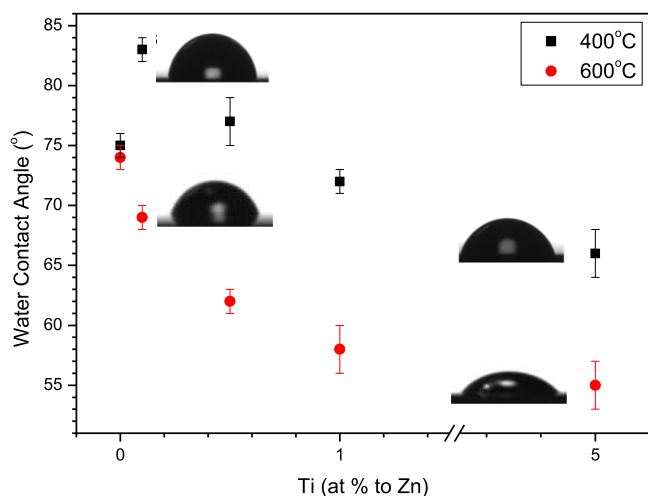


Figure 3. Variation of WCA for the samples treated at 400 °C (squares) and 600 °C (circles) and the different Ti doping from 0 (pure ZnO) to 5% Ti.

both Ti doping and annealing temperature can be derived from the image. An increasing amount of Ti in the ZnO films induced a decrease of the WCA. However, by comparing the

pure ZnO surface at 400 °C, the effect of low additions of Ti induced an increase of WCA, while this transition was to a smaller contact angle for the series annealed at 600 °C. In fact, the contact angle of pure ZnO surfaces exhibited no significant difference for the 400 and 600 °C annealed samples.

For the rest of the samples, at equivalent Ti doping, the surfaces exhibited a higher WCA at lower annealing temperatures. The overall behavior can be understood in terms of an interplay between surface chemistry and topography. An increasing TiO_x fraction induces a more hydrophilic behavior through reinforced dipolar interactions. On the other hand, the topographic effects induced by annealing at 600 °C make the surfaces more hydrophilic with respect to the equivalent at 400 °C. Such reduction of WCA for a rougher surface reinforces the idea of a strong water–surface interaction regime in agreement with the Wenzel model.²⁶

2.3. Functional Properties. For a complete analysis of the effects of the segregation of Ti to the film surface, the resistivity was measured using the van der Pauw method.²⁷ The results denoted a narrow range of surface resistivity for the series of samples annealed at 400 and 600 °C ($[1-9] \times 10^{-3}$ and $[1-5] \times 10^{-3} \Omega\text{-cm}$, respectively). However, it was not possible to establish a trend with respect to the effects of Ti doping or annealing temperature. Alternatively, Au metallic contacts were deposited through a micromask on the surfaces of pure ZnO films and those with 5% Ti doping (at both annealing temperatures) and the impedance response was analyzed.²⁸ The results are plotted in the Nyquist diagrams of Figure 4a.

Both the effects of doping and annealing show relevant influence on the final electrical properties. A simple resistor in parallel to a capacitor model (R_1 , C_1 equivalent circuit shown in the inset of Figure 4a) was observed to fit the response of all samples. The resistor can be interpreted as the direct opposition to charge transfer through the ZnO film, while the capacitor appears as a contribution of the accumulation of charge, mainly in grain boundaries and contact to sample interface.

Relevantly, the presence of Ti doping induces a considerable increase of the equivalent resistance and a decrease of the capacitor value, irrespective of the annealing temperature considered. This can be explained in terms of the microstructural/surface effects observed upon doping and annealing of ZnO films. In fact, the described tendency is compatible with the formation of a Ti–O-based grain boundary on the

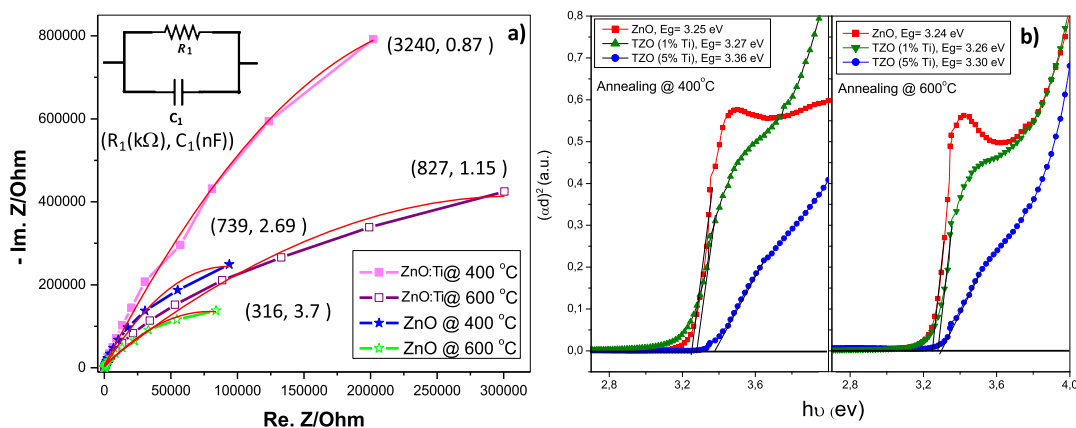


Figure 4. (a) Nyquist diagrams and impedance analysis corresponding to pure and 5% doped ZnO films after annealing at 400 and 600 °C. (b) Tauc plots for ZnO, ZnO:Ti 1%, and ZnO:Ti 5% after annealing at 400 °C (left) and 600 °C (right).

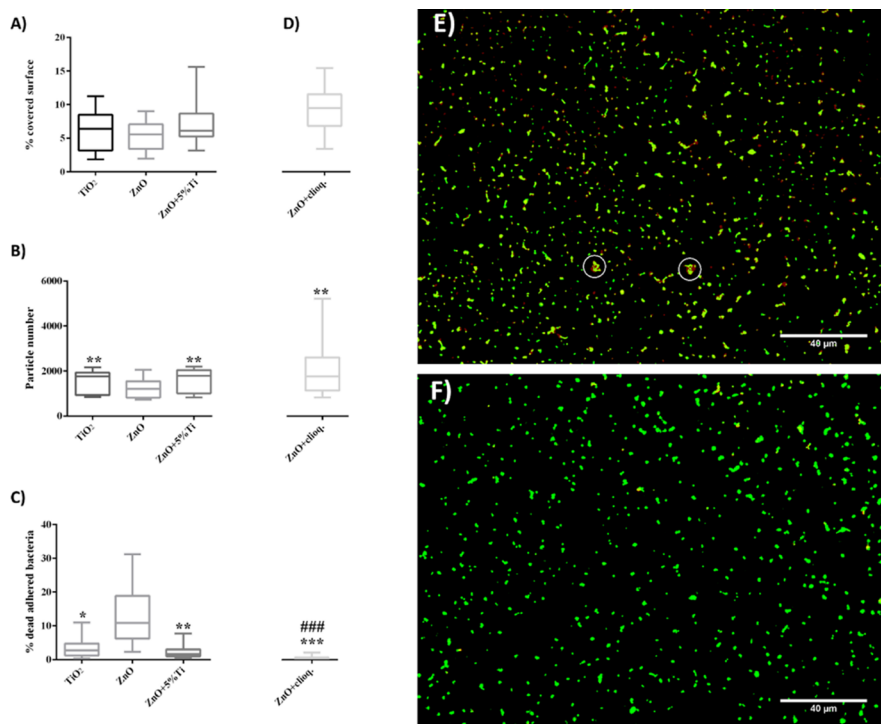


Figure 5. (a) Area of adhesion (% coverage) of *S. epidermidis* on the surfaces of ZnO doped with 5% Ti (annealed at 600 °C) compared with controls for pure ZnO and TiO₂. (b) Particle counting on the same surfaces. (c) Viability (% of dead adhered bacteria) on the same surfaces. (d) Comparison of the previous parameters on the ZnO surface in the presence of cloquinol. Fluorescence microscopy images of *S. epidermidis* adhered on the surface of ZnO without (e) and with (f) addition of cloquinol. ####: p -value < 0.0001 for Wilcoxon test compared to TiO₂. *: p -value < 0.05 for Wilcoxon test compared to ZnO. **: p -value < 0.01 for Wilcoxon test compared to ZnO. ***: p -value < 0.001 for Wilcoxon test compared to ZnO.

ZnO nanocrystals, and with the consequent promotion of a surface conduction deactivating charge accumulation in grain boundaries. These effects were, however, milder for the samples annealed at 600 °C, suggesting that grain growth has a dominant effect on favoring film conduction over the potential negative effects of surface segregation of a Ti–O-rich surface.

The effects of Ti doping on the optical properties of the films are illustrated in Figure 4b for a ZnO reference and ZnO films doped with 1 and 5% Ti. The results are illustrated in the form of Tauc plots obtained from UV–vis spectra, which reflected no characteristic absorption bands (uncolored films). Relevantly, the Tauc plots visibly illustrate the increasing spectral range induced by Ti doping. Although the optical band gap for our sol–gel reference ZnO annealed at 400 °C is 3.25 eV, this band gap is slightly widened to 3.27 eV with 1% Ti doping and up to 3.36 eV for 5% Ti-doped samples, Figure 4b (left). The main effect of the annealing at 600 °C is a slight reduction of the optical band gap, which can be correlated with the microstructural information that confirms the increase of crystallite size at this temperature. The increase of the optical band gap upon Ti doping is also related to the microstructure. In fact, the inhibition of grain growth with doping allows maintaining a crystallite size within the nanoscale, which conditions a band gap widening in ZnO materials.²⁹

2.4. Cell Adhesion. The behavior of the Ti-doped films was assayed at two different levels. We initially explored the interaction of the surfaces with bacteria. In order to limit the number of samples, the properties derived from the microstructural and physical properties was used to screen most relevant samples. To make the Ti surface segregation effects

patent on the surfaces, adhesion assays with *Staphylococcus epidermidis* were performed on ZnO films doped with 5% Ti and annealed at 600 °C in comparison with references for pure ZnO and TiO₂ samples prepared from the same precursors. We evaluated the total surface covered by adhered bacteria, the number of adhered bacterial particles on the different films, as well as the bacterial viability. The results are plotted in Figure 5.

The percentage of area covered by bacteria was the same for the three types of materials (p value = 0.1218 for Kruskal–Wallis test, Figure 5a). We found, however, at least 4.4 times more dead adhered bacteria over ZnO films with respect to Ti-containing films (11.89%, p value < 0.05 for Wilcoxon test) (Figure 5c). It has been previously described that adherence of *S. epidermidis* to abiotic surfaces is a sequential process that involves the initial adhesion mediated by autolysins and hydrophobic interactions that evolves into irreversible adherence through the action of specialized adhesins.^{30,31} Once adhered, other molecules such as aggregation-associated protein (aap) mediate bacterial accumulation, in order to start the development of a biofilm.³² In this work, molecules involved in adherence and accumulation are already expressed on the surface of the bacteria and explains the similar surface coverage observed on all the surfaces shown in Figure 5a. However, by the relatively short time of 90 min, defined by the observation of a high percentage of dead bacteria on ZnO surfaces, *S. epidermidis* has not been able to form a stable biofilm. The bactericidal behavior on ZnO is consistent with previously published literature that shows the intrinsic toxicity of ZnO due to the release of Zn²⁺ ions, which destabilize the ionic environment of the bacterial membranes.^{33,34} We did

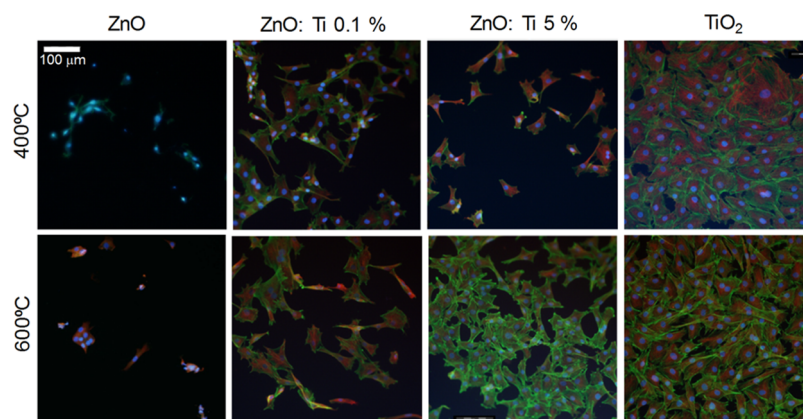


Figure 6. hMSCs cultured on the surface of the ZnO:Ti films annealed at 400 (top) and 600 °C (bottom) and different doping levels (from left to right: ZnO, ZnO:Ti 0.1%, ZnO:Ti 5%, and TiO₂). Green, actin cytoskeleton/red, α -catenin intermediate fibers/blue, DAPI nuclear staining.

additional analyses to bacterial viability by reversing the effect of Zn²⁺ ions by using the chelating agent clioquinol. In this case, the viability increased considerably, overpassing that of the surfaces containing Ti (Figure 5d).

Additionally, although the bacterial coverage of the samples was essentially the same, we found that particle counting was significantly lower when bacteria were grown on ZnO films than on the other materials (p value < 0.001), showing 31% less counts (Figure 5b). This effect on pure ZnO is potentially a consequence of the release of Zn²⁺ ions to the solution from the material. In fact, Zn²⁺ favors the aap action, present on the surface of *S. epidermidis*,³⁵ causing the higher aggregation in small groups of adhered bacteria on ZnO films, which include both live and dead ones (Figure 5e,f).

We also performed the analysis of bacterial viability by using clioquinol, obtaining a high viability (97–99%) (p value = 0.0811) on the pure ZnO samples with respect to the Ti-doped and TiO₂ controls (compare the second column in Figure 5c with the last column corresponding to clioquinol experiments shown in Figure 5d). Figure 5e,d illustrates the response of *S. epidermidis* adherence on the pure ZnO surfaces, denoting aggregation and cell death on pure ZnO films (Figure 5e), which can be chemically reversed by dosing clioquinol (Figure 5d). These results suggest that the ZnO films release zinc ions in solution, whereas the addition of 5% of Ti displays similar features to the TiO₂ surface when testing bacterial adhesion and viability.

In order to evaluate the interaction of human cells with the ZnO:Ti films, hMSCs were cultured on surfaces with different doping levels and annealing temperatures. The analysis was performed in this case for samples with minimum and maximum Ti doping (0.1 and 5% Ti) and both annealing temperatures (400 and 600 °C) taking pure ZnO and TiO₂ films as controls. The surface–material interaction was evaluated from fluorescence microscopy images obtained after 72 h of culture. Figure 6 shows the typical response of hMSCs to the different surfaces. It can be observed that cells cultured on ZnO (irrespective of annealing temperature) exhibit retracted actin cytoskeleton and intermediate catenin fibers, denoting difficulties for the progression of focal adhesions. In these conditions, cells aggregate and show a preference for cell–cell interactions rather than for cell–surface interactions. A drastic change in the interaction is observed upon integration of the smaller amount of Ti. In fact, cells spread considerably, develop polygonal shape, and exhibit

elongated filopodia, suggesting some ease for the formation of focal adhesions with respect to pure ZnO surfaces. The cells tend to keep physically interconnected but leave voids in between them in contrast with the previous behavior on pure ZnO. This tendency is reinforced when the level of Ti doping is increased to 5% and an annealing is performed at 600 °C. No drastic change is observed between the two Ti doping levels for annealing temperatures of 400 °C. Relevantly, the increase of cell spreading and total surface coverage observed on samples with 5% Ti doping and 600 °C annealing is comparable with the one observed on the TiO₂ controls. This result is in agreement with the protective character of TiO₂-coated materials and their ability to induce cell adhesion.³⁶

To establish a more quantitative evaluation of these data, we performed a morphometric analysis based on four frames of three different samples for each type of surface. The cell spreading can be considered as an indirect measurement of availability of cell binding sites on the films. However, in local environments with high cell density, cell spreading may be affected by competitive processes among the cells. The results of cell expansion area are shown in the histogram of Figure 7. In spite of the wide error bars, these data significantly illustrate the tendency of cells to favorably spread on Ti-doped surfaces, irrespective of the annealing temperature of the films.

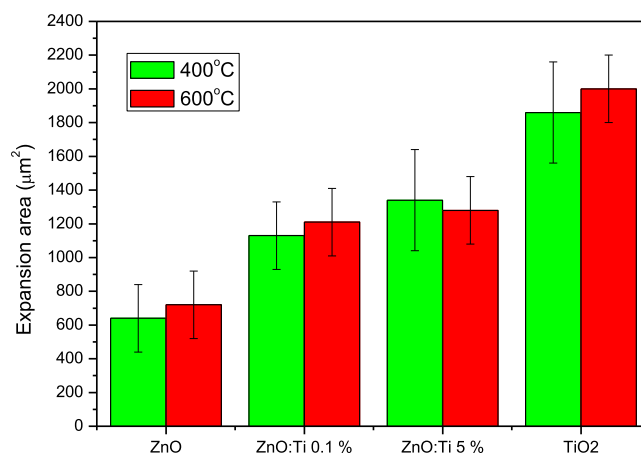


Figure 7. Expansion area of hMSCs cultured on the surface of pure ZnO, ZnO:Ti 0.1 at. %, ZnO:Ti 5 at. %, and TiO₂ after annealing at 400 and 600 °C.

The combined information obtained from the culture of bacteria and hMSCs points to an influence of ZnO solubility on the bioadhesion through an interaction with Zn^{2+} ions. However, the presence of TiO bonds, much more covalent than dominantly ionic bonds in ZnO, can determine a much more stable ground for biomolecular adsorption, a starting point in the process of cellular fouling to surfaces. Although the control of surface charge is a main aspect influencing ionic interactions with proteins and favoring protein adsorption, the phenomenon is jeopardized if the environment induces a loss of cohesive forces in the substrate material. Thus, the surface is no longer able to sustain electrostatic interactions with foreign bodies, such as proteins, being involved in a self-disruption.³⁷

In order to assess the bioadhesiveness of the ZnO:Ti films in a microdevice application, hMSCs were cultured on the surfaces of one-dimensional (1D) zigzag micropatterns on silicon substrates. For this experiment, the surfaces of ZnO doped with 5% Ti and annealing at 600 °C were chosen. The structure of the zigzag micropattern can be identified in the SEM image of Figure 8a, showing the Si/ZnO:Ti parallel lines

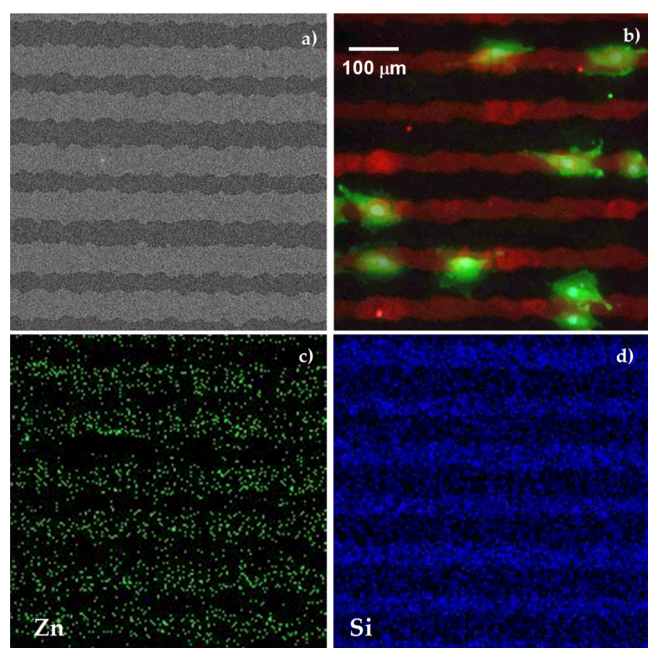


Figure 8. (a) SEM image of a ZnO:Ti/Si zigzag 1D micropattern grown with 5% Ti and annealing at 600 °C. (b) hMSCs cultured on the surface of ZnO:Ti/Si zigzag 1D micropattern (green, actin cytoskeleton/red, magnified ZnO:Ti self-fluorescence/blue, DAPI nuclear staining). (c,d) EDS complementary maps of Zn and Si, respectively.

with variable coarsening. The fluorescence microscopy results (see Figure 8b) show that, in spite of the zigzag effects, hMSCs perceive the surface of the ZnO:Ti structures as attractive for adhesion, instead of the previously illustrated and reported poor adhesion on pure ZnO.

Relevantly, the cells stand preferentially on ZnO:Ti areas rather than on Si and exhibit polarization along the main axis of the 1D ZnO:Ti structures, as illustrated by the energy-dispersive spectroscopy (EDS) maps of Zn and Si (Figure 8c,d, respectively). We underline that this selective adhesion must result from the perception of a surface-free energy contrast by hMSCs. Our contrasts have clear topographic and chemical contrasts (flat Si vs nanorough ZnO:Ti), which may

cooperatively contribute to the observed adhesion selectivity. These results point to the possibility of performing new biomedical devices incorporating transition-metal oxide conductive systems with appropriate surface designs making compatible a good degree of bioadhesiveness in culture conditions and appropriate physical properties such as electrical conductivity.

3. CONCLUSIONS

Sol–gel spin-coating allows to controllably synthesize the Ti-doped ZnO thin films on silicon substrates. The final microstructure of the films depends on the level of Ti doping and on the annealing temperature. Increase of grain size and preferential growth along the *z* axis of the ZnO wurtzite structure are favored by a high annealing temperature (600 °C) and low doping levels. Additionally, the different coordination existing between ZnO and TiO₂ leads to films enriched on Ti at surface level, especially when the Ti point defect density increases because of high doping levels. The effect can be partially induced by the heterogeneous condensation during xerogel formation but is also a result of Ti surface segregation for samples with high Ti doping levels (5%) and after annealing at high temperatures (600 °C).

The modification of the surface composition and topography inherently affects the wettability of the surfaces. Samples sintered at low temperature and with low levels of Ti doping are less hydrophilic, although this hydrophilicity is mild with WCAs over 55 °C on any sample. The surface electrical properties were affected by Ti doping, with an increase of surface resistivity to values in the 10^{−3} Ω·cm range related to Ti doping, 1 order of magnitude higher than values obtained for reference ZnO-based TCO films.³⁸ Through impedance measurements, we could confirm that the annealing at 600 °C allows improving the surface electrical resistance for films doped at 5% with respect to those annealed at 400 °C. Because of the inhibition of grain growth, the ZnO:Ti films remain transparent in the whole visible spectrum and exhibit an increase of the band gap with respect to pure ZnO films obtained with equivalent deposition/annealing process.

The response of *S. epidermidis* to culture on ZnO surfaces evidences that the intrinsic release of Zn^{2+} ions has an effect in the bacterial viability and expansion on pure ZnO. This effect can be reverted by adding the Zn^{2+} chelating agent clioquinol, which underlines the role of the ionic species in the determination of the fate of the bacterial cells. Relevantly, the ZnO:Ti and TiO₂ surfaces are also able to reverse the ionic damage, which suggests that the Ti doping level of 5% is highly efficient in providing a stable ground for cell bacterial adherence.

The adhesion of hMSCs on ZnO:Ti samples has been evaluated in comparison with ZnO and TiO₂ controls. The cells adhere and increasingly expand over the surface of ZnO:Ti samples in agreement with a higher Ti doping level. The most attractive response in terms of the number of adhered cells and cell expansion is obtained for ZnO:Ti 5% after annealing at 600 °C. These conditions were used to create a basic microdevice consisting of 1D zigzag stripes. The created 1D micropattern exhibits preferential adhesion of hMSCs with respect to the Si substrate and is observed to induce cell polarization after 72 h of culture.

These results confirm that the formation of Ti-doped ZnO films is a reliable route for the fabrication of TCO thin films retaining a good degree of bioadhesiveness. This allows cell

expansion and keeps relevant physical properties such as conductivity, which are crucial for the development of new optoelectronic biodevices, such as for sensing or energy harvesting, which will require programmable lifetimes.

4. EXPERIMENTAL SECTION

4.1. Materials Processing. A solution of zinc acetate in ethanol was prepared in concentration 0.2 M. Ethanolamine was added to the solution as a chelating agent, which allows the control of the gelation and also avoids the premature linking between metallic centers. The mixture was under reflux (30–40 °C) and magnetic stirring.^{10,39} After 8 h, zinc acetate was completely dissolved and stabilized in the ethanol solution. Titanium isopropoxide ($\text{Ti}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_4$) was dissolved in ethanol in 0.2 M concentration. HCl (115 μL) was added to the solution to induce an acid catalysis.⁴⁰

Several sols were prepared to obtain different Ti concentrations. The doping level of Ti ranged from 0.1 to 5% of Zn concentration. For labeling purposes, the samples identified with “ZnO:Ti n %” refer to a ZnO thin film with n % Ti doping. Si substrates with (1 0 0) orientation were used after cleaned with ethanol and dried in N_2 flow. The sol (50 μL) was cast on the Si surface while spinning at 2500 rpm. After 40 s, the first xerogel film was formed upon solvent evaporation. Annealing treatment was applied at temperatures 400 and 600 °C to form a dense polycrystalline film. The spin-coating–annealing sequence was applied until six cumulative layers had been deposited.

For the fabrication of the micropatterned ZnO:Ti, ZnO:Ti 5% films were used after annealing at 600 °C in a process illustrated in Figure S3. A positive photoresist (Ariston-20 series) was deposited by spin-coating on the ZnO:Ti film (spin time 25 s, spin speed 4000 rpm) and then dried on a hot plate at 70 °C for 15 min (Figure S3, 1–3). The photoresist/film stack was then exposed through an acetate slide printed mask to UV radiation for 3 min (Hamamatsu LC-L1 UV-LED spot light source, 1 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$) (Figure S3, 4). The photoresist micropattern was then developed by immersing the sample in 0.35 M NaOH solution for 2 min (Figure S3, 5). The ZnO:Ti film was then sacrificed in a HF/HNO_3 (2:2) solution for 1 min, adapting recipes for wet etching of other Ti-containing sol–gel compounds (Figure S3, 6).⁴¹ The photoresist was finally lift-off in acetone and the remaining micropattern was cleaned in ethanol and distilled water (Figure S3, 7).

4.2. Materials Characterization. The crystallinity and crystal orientation of the samples were identified by XRD with $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$) radiation using a Siemens D5000 HR diffractometer. The intensity was determined in the $20^\circ < \theta < 70^\circ$ range in glazing angle configuration (0.5°). The morphology and thickness of the Ti:ZnO films were studied by FE-SEM in a Philips XL-40FEG operated at 10 kV on cross-sectional samples with no metallization coating. Additional SEM imaging and elementary maps on micropatterned samples were obtained with a Hitachi S-3000N equipped with an INCAx-sight EDX system from Oxford Instruments. AFM was used to monitor the differences in surface roughness of the ZnO substrates. The AFM used for these experiments was a Nanotec Electrónica (Madrid, Spain). All images were collected with rectangular Pyrex-Nitride AFM probes with Cr/Au coating and spring constant of 0.23 N/m and resonance frequency of 12, 64 kHz (PNP-DB-50, NanoWorld, Innovative Technologies, Neuchâtel, Switzerland). Images were processed by the WSxM software 5.0 develop 9.0.⁴² AFM images were

collected with 512 points in contact mode. Roughness analysis was determined by the R_{rms} .

The elemental composition and chemical bonding of the ZnO:Ti thin films was analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy in a SPECS PHOIBOS 150 9MCD. A monochromatic Al X-ray source non-Focus-200W-12kV was employed. The survey and core-level spectra were obtained for each sample with a pass energy of 75 and 25 eV, respectively. The spectra were analyzed using CASA XPS software. RBS was used to determine the in-depth elemental composition of ZnO:Ti films including Zn, O, Ti, and C. The incident ions were 4He with an energy of 4.26 MeV to induce C resonant conditions, which drastically increase the detection sensitive-ness to this impurity. For spectra simulation, we used SIMNRA software⁴³ and experimental cross sections for non-Rutherford scattering from C.⁴⁴

Resistivity was measured using a four-point station applying van der Pauw's method.²⁷ Additionally, the electrical properties of the Ti-doped ZnO films were studied by electrochemical impedance spectroscopy using a Bio-Logic SP-150 system after deposition of Au surface contacts. Data acquisition was performed in a Faraday cage between two surface electrodes up to 1 kHz frequency applying a 0.5 V amplitude signal. Fitting of data to equivalent circuits was performed using the EC-Lab software (Bio-Logic Instruments). Static WCA measurements were carried out in a KSW 100 with droplet volumes of 3 μL . Results are shown as the mean value of five droplets deposited on the different ZnO:Ti films.

4.3. In Vitro Evaluation. A *S. epidermidis* ATCC 35984 strain adherence study was performed using a modified protocol described by Kinnari et al.⁴⁵ Briefly, bacteria were suspended and diluted in 0.9% NaCl saline solution (SS) (B. Braun, Melsungen, Germany), reaching 10^8 colony-forming units (cfu)/mL bacterial solution, and 5 mL of this solution was incubated onto the samples in a sterile nontreated six-well plate (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) at 37 °C for 90 min in order to allow adhesion in a static model. These experimental conditions favor the bacteria/metal oxide interaction.⁴⁶ After incubation, the samples were washed three times with SS to remove the unattached bacteria. The samples were then stained with the Live/Dead BacLight bacterial viability kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) and rinsed with sterile water.⁴⁷ Ten photographs (40 \times magnification) were taken in a DM 2000 fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) for each sample. The percentage of the total surface with adhered bacteria and the percentages of dead and live bacteria were calculated and analyzed by using ImageJ software. The effect of the Zn^{2+} cation was chelated by clioquinol at 1% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Each experiment was performed in triplicate. Statistical analysis was performed by pairwise comparisons using the nonparametric Wilcoxon test and by nonparametric Kruskal–Wallis test for more than two groups, with a level of statistical significance of $p < 0.05$ using StataCorp software. Values are cited and represented as medians.

hMSCs were used as they are progenitors of osteochondral and adipose tissues, which allow providing a more generalized bioadhesiveness evaluation than other specialized lineages. hMSCs from healthy donors were provided by Hospital Universitario La Princesa (Madrid, Spain). Their use for research was approved by the ethical committee of the hospital upon informed consent from the donors. ZnO:Ti surfaces were

sterilized in UV, washed with phosphate-buffered saline (PBS), and seeded with 15×10^3 cells. hMSCs were incubated for 72 h (DMEM-LG adjusted to 10% fetal bovine serum) at 37 °C in 5% CO₂. After culture, hMSCs were washed with PBS and fixed with 3.7% formaldehyde in PBS. For immune staining, cells were permeated in 0.5% Triton X-100 (CSK buffer; 100 mM NaCl, 10 mM pipes pH 6.8, 3 mM MgCl₂, 3 mM EGTA, and 0.3 M sucrose). The samples were blocked with 1% bovine serum albumin in PBS. Primary reactions took place with sera from autoimmune mice. After washing, the surfaces were incubated in dark conditions with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1:5000, Calbiochem), actin (green), and α -catenin (red) secondary antibodies. The surfaces were washed, dehydrated with absolute ethanol (Merck), and mounted with Mowiol/Dabco (Calbiochem). hMSCs were visualized in a fluorescence inverted microscope (Olympus IX81) coupled with a charge-coupled device color camera and analyzed using ImageJ.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsomega.9b00646.

Evolution of crystallite size as a function of Ti doping for annealing temperatures of 400 and 600 °C, characterization of the films by C-resonant RBS, and (c) detailed scheme of micropattern formation on ZnO:Ti (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: miguel.manso@uam.es.

ORCID

Rehab Ramadan: 0000-0002-2479-0671

Miguel Manso Silván: 0000-0002-5063-1607

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Funding was received through grants CTQ2017-84309-C2-2-R from Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades and NanoNeuroDev 2017/EEUU/11 from Santander-Universidad.

■ REFERENCES

- (1) Zhang, Y.; Nayak, T.; Hong, H.; Cai, W. Biomedical Applications of Zinc Oxide Nanomaterials. *Curr. Mol. Med.* **2013**, *13*, 1633–1645.
- (2) Jeong, W.-J.; Park, G.-C. Electrical and optical properties of ZnO thin film as a function of deposition parameters. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2001**, *65*, 37–45.
- (3) Chen, P. H.; Chen, Y. A.; Chang, L. C.; Lai, W. C.; Kuo, C. H. Low operation voltage of GaN-based LEDs with Al-doped ZnO upper contact directly on p-type GaN without insert layer. *Solid-State Electron.* **2015**, *109*, 29–32.
- (4) Hussain, B.; Ebong, A.; Ferguson, I. Zinc oxide as an active n-layer and antireflection coating for silicon based heterojunction solar cell. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2015**, *139*, 95–100.
- (5) Shirahata, T.; Kawaharamura, T.; Fujita, S.; Orita, H. Transparent conductive zinc-oxide-based films grown at low temperature by mist chemical vapor deposition. *Thin Solid Films* **2015**, *597*, 30–38.
- (6) Yang, J.; Huang, J.; Ji, H.; Tang, K.; Zhang, L.; Ren, B.; Cao, M.; Wang, L. Effect of RF power and substrate temperature on the properties of boron and gallium co-doped ZnO films. *Mater. Sci. Semicond. Process.* **2016**, *53*, 84–88.
- (7) Zhang, Y.; Zhang, X.; Zhang, X.; Wang, Y.; Dong, J.; Huang, L.; Zhang, S.; Han, D.; Cui, G.; Cong, Y. Sn-doped ZnO thin-film transistors with AZO, TZO and Al heterojunction source/drain contacts. *Electron. Lett.* **2016**, *52*, 302–304.
- (8) Caretti, I.; Yuste, M.; Torres, R.; Sánchez, O.; Jiménez, I.; Escobar Galindo, R. Coordination chemistry of titanium and zinc in Ti(1-x)Zn_{2x}O₂ (0 ≤ x ≤ 1) ultrathin films grown by DC reactive magnetron sputtering. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 2696–2699.
- (9) Farid, S.; Mukherjee, S.; Sarkar, K.; Mazouchi, M.; Stroschio, M. A.; Dutta, M. Enhanced optical properties due to indium incorporation in zinc oxide nanowires. *Appl. Phys. Lett.* **2016**, *108*, 021106.
- (10) Gallach, D.; Le Brizoul, L.; Gautier, N.; Ynsa, M. D.; Costa, V. T.; Ceccone, G.; Landesman, J. P.; Silván, M. M. Microstructure based optical modeling of ZnO-porous silicon permeated nanocomposites. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2015**, *48*, 295102.
- (11) Xiong, H.-M.; Xu, Y.; Ren, Q.-G.; Xia, Y.-Y. Stable aqueous ZnO@polymer core-shell nanoparticles with tunable photoluminescence and their application in cell imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7522–7523.
- (12) Stein, A.; Schroden, R. C. Colloidal crystal templating of three-dimensionally ordered macroporous solids: materials for photonics and beyond. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2001**, *5*, 553–564.
- (13) Gilbert, B.; Fakra, S. C.; Xia, T.; Pokhrel, S.; Mädler, L.; Nel, A. E. The Fate of ZnO Nanoparticles Administered to Human Bronchial Epithelial Cells. *ACS Nano* **2012**, *6*, 4921–4930.
- (14) Muhammad, F.; Guo, M.; Guo, Y.; Qi, W.; Qu, F.; Sun, F.; Zhao, H.; Zhu, G. Acid degradable ZnO quantum dots as a platform for targeted delivery of an anticancer drug. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 13406–13412.
- (15) Singh, S. P.; Arya, S. K.; Pandey, P.; Malhotra, B. D.; Saha, S.; Sreenivas, K.; Gupta, V. Cholesterol biosensor based on rf sputtered zinc oxide nanoporous thin film. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91*, 063901.
- (16) Qi, J.; Zhang, H.; Ji, Z.; Xu, M.; Zhang, Y. ZnO nano-array-based EGFET biosensor for glucose detection. *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* **2015**, *119*, 807–811.
- (17) You, J.; Jang, K.; Lee, S.; Bang, D.; Haam, S.; Choi, C.-H.; Park, J.; Na, S. Label-free detection of zinc oxide nanowire using a graphene wrapping method. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *68*, 481–486.
- (18) Franklin, N. M.; Rogers, N. J.; Apte, S. C.; Batley, G. E.; Gadd, G. E.; Casey, P. S. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 8484–8490.
- (19) Carrascón, R. D.; Pérez, D. G.; Ruiz, J. P. C.; Silván, M. M. Compared Biocompatibility of ZnTiO₃, ZnO and TiO₂ Sol-Gel Films with Human Mesenchymal Stem Cells. *MRS Adv.* **2016**, *1*, 737–742.
- (20) Szewczyk, S.; Giera, W.; D'Haene, S.; van Grondelle, R.; Gibasiewicz, K. Comparison of excitation energy transfer in cyanobacterial photosystem I in solution and immobilized on conducting glass. *Photosynth. Res.* **2017**, *132*, 111–126.
- (21) Yaghoubi, H.; Schaefer, M.; Yaghoubi, S.; Jun, D.; Schlaf, R.; Beatty, J. T.; Takshi, A. A ZnO nanowire bio-hybrid solar cell. *Nanotechnology* **2017**, *28*, 054006.
- (22) Patterson, A. L. The Scherrer formula for x-ray particle size determination. *Phys. Rev.* **1939**, *56*, 978–982.
- (23) Wagner, C. D.; Riggs, W. M.; Davis, L. E.; Moulder, J. F.; Muilenberg, G. E. *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*; Eden Prairie: Minnesota, 1979.
- (24) Zhong, Z. Y.; Zhang, T. Microstructure and optoelectronic properties of titanium-doped ZnO thin films prepared by magnetron sputtering. *Mater. Lett.* **2013**, *96*, 237–239.
- (25) Wang, X.; Zhang, F.; Zheng, Z.; Chen, L.; Wang, H.; Li, C.; Lui, X. Chemical composition and structure of titanium oxide films deposited on LTI-carbon by IBED. *Thin Solid Films* **2000**, *365*, 94–98.

- (26) Wenzel, R. N. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Ind. Eng. Chem.* **1936**, 28, 988–994.
- (27) van der Pauw, L. J. A method of measuring specific resistivity and Hall effect of discs of arbitrary shape. *Philips Res. Rep.* **1958**, 13, 1–9.
- (28) Ben Belgacem, R.; Chaari, M.; Braña, A. F.; Garcia, B. J.; Matoussi, A. Structural, electric modulus and complex impedance analysis of ZnO/TiO₂ composite ceramics. *J. Am. Ceram. Soc.* **2017**, 100, 2045–2058.
- (29) Wang, Z. L. Nanostructures of zinc oxide. *Mater. Today* **2004**, 7, 26–33.
- (30) Arciola, C. R.; Campoccia, D.; Montanaro, L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, 16, 397–409.
- (31) Otto, M. Staphylococcus epidermidis - the 'accidental' pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7, 555–567.
- (32) McCann, M. T.; Gilmore, B. F.; Gorman, S. P. Staphylococcus epidermidis device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J. Pharm. Pharmacol.* **2008**, 60, 1551–1571.
- (33) Zhang, L.; Ding, Y.; Povey, M.; York, D. ZnO nanofluids - A potential antibacterial agent. *Prog. Nat. Sci.: Mater. Int.* **2008**, 18, 939–944.
- (34) Brayner, R.; Ferrari-Iliou, R.; Brivois, N.; Djediat, S.; Benedetti, M. F.; Fiévet, F. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett.* **2006**, 6, 866–870.
- (35) Conrady, D. G.; Brescia, C. C.; Horii, K.; Weiss, A. A.; Hassett, D. J.; Herr, A. B. A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, 105, 19456–19461.
- (36) Manso, M.; Ogueta, S.; García, P.; Pérez-Rigueiro, J.; Jiménez, C.; Martínez-Duart, J. M.; Langlet, M. Mechanical and in vitro testing of aerosol-gel deposited titania coatings for biocompatible applications. *Biomaterials* **2002**, 23, 349–356.
- (37) Palacio, M. L. B.; Bhushan, B. Bioadhesion: a review of concepts and applications. *Philos. Trans. R. Soc., A* **2012**, 370, 2321–2347.
- (38) Ben Ayadi, Z.; Mahdhi, H.; Djessas, K.; Gauffier, J. L.; El Mir, L.; Alaya, S. Sputtered Al-doped ZnO transparent conducting thin films suitable for silicon solar cells. *Thin Solid Films* **2014**, 553, 123–126.
- (39) Woo, J.-C.; Um, D.-S.; Kim, C.-I. The dry etching of a sol-gel deposited ZnO thin film in a high density BCl₃/Ar plasma. *Thin Solid Films* **2010**, 518, 2905–2909.
- (40) Langlet, M.; Burgos, M.; Coutier, C.; Jimenez, C.; Morant, C.; Manso, M. Low temperature preparation of high refractive index and mechanically resistant sol-gel TiO₂ films for multilayer antireflective coating applications. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2001**, 22, 139–150.
- (41) Zhang, T.; Huang, H.; Chen, R. Wet Chemical Etching Process of BST Thin Films for Pyroelectric Infrared Detectors. *Ferroelectrics* **2011**, 410, 137–144.
- (42) Horcas, I.; Fernández, R.; Gomez-Rodriguez, J. M.; Colchero, J.; Gómez-Herrero, J.; Baro, A. M. WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, 78, 013705.
- (43) Mayer, M. SIMNRA, a simulation program for the analysis of NRA, RBS and ERDA. *Application of Accelerators in Research and Industry, Pts 1 and 2*, 1999; Vol. 47S, pp 541–544.
- (44) Leavitt, J. A.; McIntyre, L. C.; Stoss, P.; Oder, J. G.; Ashbaugh, M. D.; Dezfouly-Arjomandy, B.; Yang, Z. M.; Lin, Z. Cross-sections for 170.5-degrees backscattering of he-4 from carbon for he-4 energies between 1.6 and 5.0 meV. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **1989**, 40-41, 776–779.
- (45) Kinnari, T. J.; Soininen, A.; Esteban, J.; Zamora, N.; Alakoski, E.; Kouri, V. P.; Lappalainen, R.; Kontinen, Y. T.; Gomez-Barrena, E.; Tiainen, V. M. Adhesion of staphylococcal and Caco-2 cells on diamond-like carbon polymer hybrid coating. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2008**, 86, 760–768.
- (46) Djurišić, A. B.; Leung, Y. H.; Ng, A. M. C.; Xu, X. Y.; Lee, P. K. H.; Degger, N.; Wu, R. S. S. Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles: Mechanisms, Characterization, and Avoiding Experimental Artefacts. *Small* **2015**, 11, 26–44.
- (47) Boulos, L.; Prévost, M.; Barbeau, B.; Coallier, J.; Desjardins, R. LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods* **1999**, 37, 77–86.

RESEARCH ARTICLE

Non-pigmented rapidly growing mycobacteria smooth and rough colony phenotypes pathogenicity evaluated using *in vitro* and experimental models

Marta García-Coca^{1,*†}, John-Jairo Aguilera-Correa¹, Arancha Ibáñez-Apesteguía², Graciela Rodríguez-Sevilla¹, David Romera-García¹, Ignacio Mahíllo-Fernández³, Gabriel Reina², Mirian Fernández-Alonso², José Leiva², María-Carmen Muñoz-Egea¹, José Luis Del Pozo⁴ and Jaime Esteban^{1,‡}

¹Department of Clinical Microbiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, 28040, Madrid, Spain, ²Microbiology Service, Clínica Universidad de Navarra, 31008, Pamplona, Spain, ³Department of Epidemiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, 28040, Madrid, Spain and ⁴Microbiology Service and Infectious Diseases Area, Clínica Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain

*Corresponding author: Dept. of Clinical Microbiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain. Tel/Fax: +34 915 504 900; E-mail: marta.gcoca@gmail.com

One sentence summary: Knowledge of mycobacteria colony phenotype could have implications for the interpretation of the clinical importance of the isolates and the development of experimental model with *G. mellonella* has demonstrated effectiveness.

Editor: Patrick Brennan

[†]Marta García-Coca, <http://orcid.org/0000-0001-9274-0070>

[‡]Jaime Esteban, <http://orcid.org/0000-0002-8971-3167>

ABSTRACT

Non-pigmented rapidly growing mycobacteria (NPRGM) are widely distributed in water, soil and animals. It has been observed an increasing importance of NPRGM related-infections, particularly due to the high antimicrobial resistance. NPRGM have rough and smooth colony phenotypes, and several studies have showed that rough colony variants are more virulent than smooth ones. However, other studies have failed to validate this observation. In this study, we have performed two models, *in vitro* and *in vivo*, in order to assess the different pathogenicity of these two phenotypes. We used collection and clinical strains of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. On the *in vitro* model (macrophages), phagocytosis was higher for *M. abscessus* and *M. fortuitum* rough colony variant strains when compared to smooth colony variants. However, we did not find differences with colonial variants of *M. chelonae*. Survival of *Galleria mellonella* larvae in the experimental model was lower for *M. abscessus* and *M. fortuitum* rough colony variants when compared with larvae infected with smooth colony variants. We did not find differences in larvae infected with *M. chelonae*. Results of our *in vivo* study correlated well with the experimental model. This fact could have implications on the interpretation of the clinical significance of the NPRGM isolate colonial variants.

Received: 10 May 2019; Accepted: 11 September 2019

© FEMS 2019. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Keywords: rapidly growing mycobacteria; *Galleria mellonella*; macrophages; rough colony; smooth colony

INTRODUCTION

Non-pigmented rapidly growing mycobacteria (NPRGM) is a term that refers to a group of mycobacteria species, all of which are ubiquitous and are distributed widely in environment or have been isolated from a variety of environmental samples (Brown-Elliott and Wallace 2002; van Ingen et al. 2009). All NPRGM species can be pathogens under determinate host factors (Howard and Byrd 2000). Infections caused by these mycobacteria have increased in recent years as a result of their broad distribution in nature (van Ingen et al. 2009), and the increasing incidence of immunosuppression states. NPRGM infections are characterized by antimicrobial and disinfectant resistance (Brennan and Nikaido 1995; Falkinham III 2009) and their ability to form biofilms (Esteban and Garcia-Coca 2018). Among all NPRGMs, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium fortuitum* have the highest clinical relevance (Brown-Elliott and Wallace 2002; Esteban et al. 2008). *M. abscessus* is one of the main causative agents of non-tuberculous mycobacterial lung disease and is often isolated in patients with chronic lung diseases as bronchiectasis, chronic obstructive pulmonary disease and lung cavities where NPRGM are able to grow as biofilms (Arend, van Soolingen and Ottenhoff 2009) (Griffith et al. 2007). *M. abscessus* is also considered an emerging pathogen able to colonize or infect cystic fibrosis patient's lungs (Qvist et al. 2014; Floto et al. 2016). *M. chelonae* and *M. fortuitum* are frequently isolated in relation with skin and soft-tissue infections (Yu et al. 2013; Cho et al. 2014); however, they can also be isolated from other clinical samples causing a diverse range of infection, such as bloodstream, prosthetic joint or catheter-related infections (Hakim, Hisam and Reuman 1993; De Groote and Huitt 2006; El Helou et al. 2013).

NPRGM have rough and smooth colony phenotypes when cultured *in vitro*. A number of studies have found a significant correlation between colony morphology and virulence, with rough variants being usually more virulent than those with a smooth colony morphology (Schaefer, Davis and Cohn 1970; Collins and Cunningham 1981; Belisle and Brennan 1989; Byrd and Lyons 1999). Different authors have reported that colony phenotype is related to the amount of cell-wall glycopeptidolipids (GPL) (Barrow and Brennan 1982; Eckstein et al. 2000), with the smooth variants having a higher level of GPL and with a better ability to form biofilms; however, they have a lower ability to cause eukaryotic cells invasion (Byrd and Lyons 1999; Howard et al. 2006). Genetic studies have demonstrated that GPL is necessary for both biofilm formation and sliding motility in *Mycobacterium smegmatis* (Recht et al. 2000). On the other hand, rough colony variants express a minimal amount of GPL, being more invasive than smooth variants but unable to form biofilms (Byrd and Lyons 1999; Howard et al. 2006).

Furthermore, *Galleria mellonella* has an innate cellular immune response in which plasmatocytes and granular cells are involved, which makes it ideal for the study of mycobacterial infections (Meir, Grosfeld and Barkan 2018).

In order to evaluate the invasive ability and virulence of *M. abscessus*, *M. chelonae* and *M. fortuitum* smooth colony variant (SCV) and rough colony variant (RCV) phenotypes, we studied several strains of each species using a macrophagic cell line and a *G. mellonella* larvae *in vivo* model, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Strains

NPRGM used in these experiments were three collection strains (i.e. *M. abscessus* DSM 44196, *M. chelonae* ATCC 19235 and *M. fortuitum* ATCC 6841), all three being SCV and three clinical strains of each mycobacteria isolated in the Fundación Jiménez Díaz Hospital Department of Clinical Microbiology (one SCV and two RCV) (Table 1).

Macrophage J-774A.1 *in vitro* model

J-774A.1 (ATCC® TIB-67) is a macrophage cell line obtained from the ascitic fluid of mice with reticular cell sarcoma. For our experiments, these macrophages were maintained in the Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI; Gibco®, Massachusetts, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) and antibiotics (RPMI10). We evaluated strain pathogenicity by analyzing phagocytosis as detailed: We formed a monolayer of cells on 96-well flat-bottom polystyrene plates (Falcon®, Corning, NY, USA) by adding 200 µL per well of cell suspension containing 30 000 cells per mL of RPMI10 and 48 hours of incubation (37°C, 5% CO₂). Afterward, we washed the wells three times with 150 µL of sterile PBS in order to eliminate the antibiotic in maintenance media. All mycobacterial strains were incubated in 7H9 (BD, United States) medium at 37°C for 72 hours in an orbital shaker (80 rpm). We infected the cells with a 150-µL suspension of 0.5 McFarland of each strain in Middlebrook 7H9 medium for 1 hour of incubation (37°C, 5% CO₂). We washed the wells three times with 150 µL of sterile PBS in order to eliminate extracellular mycobacteria. Finally, we performed a hypotonic lysis of the infected cells by adding 150 µL of sterile water to each well to break the cytoplasmatic membrane and to release intracellular bacteria (Baltch et al. 2005; Lefebvre et al. 2016). We did bacterial counts by means of the drop plate method (Herigstad, Hamilton and Heersink 2001) on Trypcase Soy agar + 5% sheep blood agar plates (TSS, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). We used a negative control (cells without bacteria) for each experiment and we performed experiments by triplicate.

Galleria mellonella *in vivo* model

We stored larvae of *G. mellonella* (BioSystems Technology Ltd, Exeter, Devon, UK) at 15°C for 24 hours before use. All mycobacterial strains were incubated in 7H9 medium at 37°C for 72 hours in an orbital shaker (80 rpm). We infected larvae (i.e. in groups of ten) with 10 µL inoculum of each strain (1 McFarland turbidity scale, 10⁶ colony forming units, CFU) by intrahemocoelic injection through the last left proleg and incubated at 37°C. Larvae survival, activity, cocoon formation and melanization were evaluated at 24-hour intervals for 168 hours according to the *G. mellonella* Health Index Scoring System (Loh et al. 2013) (Table 2). A group inoculated with sterile saline solution and a non-manipulated group were used as negative controls. We recovered inoculated mycobacterial strains from each dead larva by mean of culture.

Table 1. Mycobacteria strains used in the experiments.

Strain	Microorganism	Origin	Colony morphology
MA DSM 44196	<i>M. abscessus</i> DSM 44196	Reference Collection	Smooth
MA 1	<i>M. abscessus</i> sub. <i>abscessus</i>	Sputum	Smooth
MA 2	<i>M. abscessus</i> sub. <i>abscessus</i>	Adenopathy	Rough
MA 3	<i>M. abscessus</i> sub. <i>massiliense</i>	Sputum	Rough
MF ATCC 6841	<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	Reference Collection	Smooth
MF 1	<i>M. fortuitum</i>	Sputum	Smooth
MF 2	<i>M. fortuitum</i>	Larynx biopsy	Rough
MF 3	<i>M. fortuitum</i>	Shoulder prosthesis	Rough
MC ATCC 19235	<i>M. chelonae</i> ATCC 19235	Reference Collection	Smooth
MC 1	<i>M. chelonae</i>	Sputum	Smooth
MC 2	<i>M. chelonae</i>	Vitreous humor	Rough
MC 3	<i>M. chelonae</i>	Wound exudate	Rough

Table 2. *G. mellonella* Health Index Scoring System.

Category	Description	Score
Survival	Dead	0
	Alive	2
Activity	No movement	0
	Minimal movement on stimulation	1
	Move when stimulated	2
	Move without stimulation	3
Melanization	Black larvae	0
	Black spots on brown larvae	1
	≥3 spots on beige larvae	2
	≤3 spots on beige larvae	3
	No melanization	4
Cocoon formation	No cocoon	0
	Partial cocoon	0.5
	Full cocoon	1

Statistical analysis

We performed statistical analysis by using Stata Statistical software, Release 11 (StataCorp2009).

We used non-parametric Wilcoxon test for a pairwise comparison of the cellular experiments using median and interquartile range values.

For the *G. mellonella* in vivo model, we used a log-rank test to perform a pairwise comparison of the Kaplan–Meier survival curves of two groups. We evaluated activity and melanization scores using a linear regression model and a we used a parametric Student's t-test to perform a pairwise comparison of slopes, taking into account either the equality or inequality of the slope values.

We considered a level of statistical significance of $P < 0.05$ in all tests.

RESULTS

Macrophage J-774A.1 in vitro model

We did not find significant differences in bacterial counts of macrophage (i.e. log CFU/10⁴) between *M. abscessus* DSM 44196 and MA1 strains (both SCV) ($P = 1.000$), while the CFU count was higher in MA3 than in MA2 (both RCV) ($P = 0.024$). Phagocytosis was higher in RCV strains (MA2 and MA3) when compared

to SCV strains (*M. abscessus* DSM 44196 and MA1) ($P = 0.0003$) (Fig. 1A).

We detected a significant difference in phagocytosis between the RCV of *M. fortuitum* (MF2 and MF3) and SCV strains (*M. fortuitum* ATCC 6841 and MF1), with higher values found in RCV strains ($P = 0.0001$). We did not observe significant differences between the two SCV strains ($P = 0.837$), but the log CFU/10⁴ cell count was higher in MF2 in comparison to MF3, both of which were RCV strains ($P = 0.004$) (Fig. 1B).

The extent of phagocytosis by either of the *M. chelonae* colony variants was the same, thus no significant differences were found between any of the four strains ($P > 0.05$) (Fig. 1C).

Galleria mellonella in vivo model

In all the experiments with *G. mellonella* larvae, no differences in mortality between the saline solution group and non-manipulated group were found ($P = 0.860$) (data not shown). We observed statistically significant differences when we compared mortality between all infected groups and negative controls ($P < 0.001$ for all strains) (Fig. 2).

There was a similar mortality in both groups of larvae infected with *M. abscessus* RCV strains ($P = 0.595$), and similar results were obtained when we compared the two SCV strains ($P = 0.201$).

Survival was significantly higher for the SCV group than the RCV group ($P < 0.001$) when we compared total larvae infected with SCV strains ($n = 60$) related to those infected with RCV strains ($n = 60$) (Fig. 2A).

Findings were similar for larvae infected with *M. fortuitum*, between the two SCV strains ($P = 1.000$) but we found statistically significant differences between the two clinical RCV strains ($P = 0.008$), as MF3 strain caused higher mortality than MF2. Larvae infected with the two SCV strains ($n = 60$) showed higher survival than those from the other groups ($n = 60$) infected with RCV strains ($P < 0.001$). When each RCV strain was compared to each SCV strain, RCV caused significantly more mortality than SCV ($P < 0.05$) in all cases (Fig. 2B).

When we compared the mortality of each *M. chelonae* strain in relation with the control group, the mortality rate was higher in infected groups in all cases ($P < 0.001$). However, with this species, we did not find significant differences in survival between SCV and RCV strains ($P = 0.338$). In addition, we did not find differences when strains were compared to each other ($P > 0.05$) (Fig. 2C).

As for the activity score, the highest value was found in the control group. In the *M. abscessus* infection model, the slope of

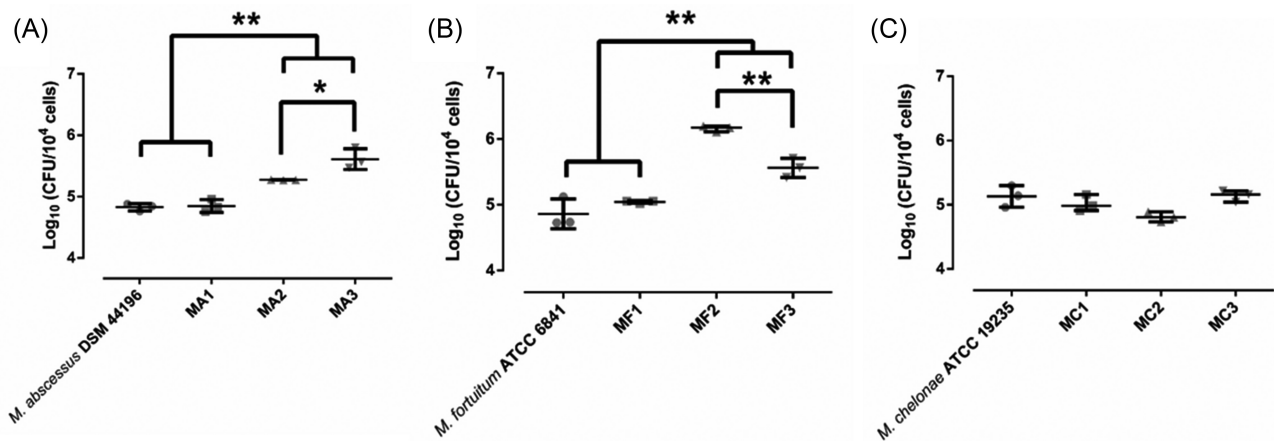


Figure 1. Representation of the CFU/10⁴ cell count of mycobacteria phagocytosed by macrophages J-774A.1. (*) Statistically significant.

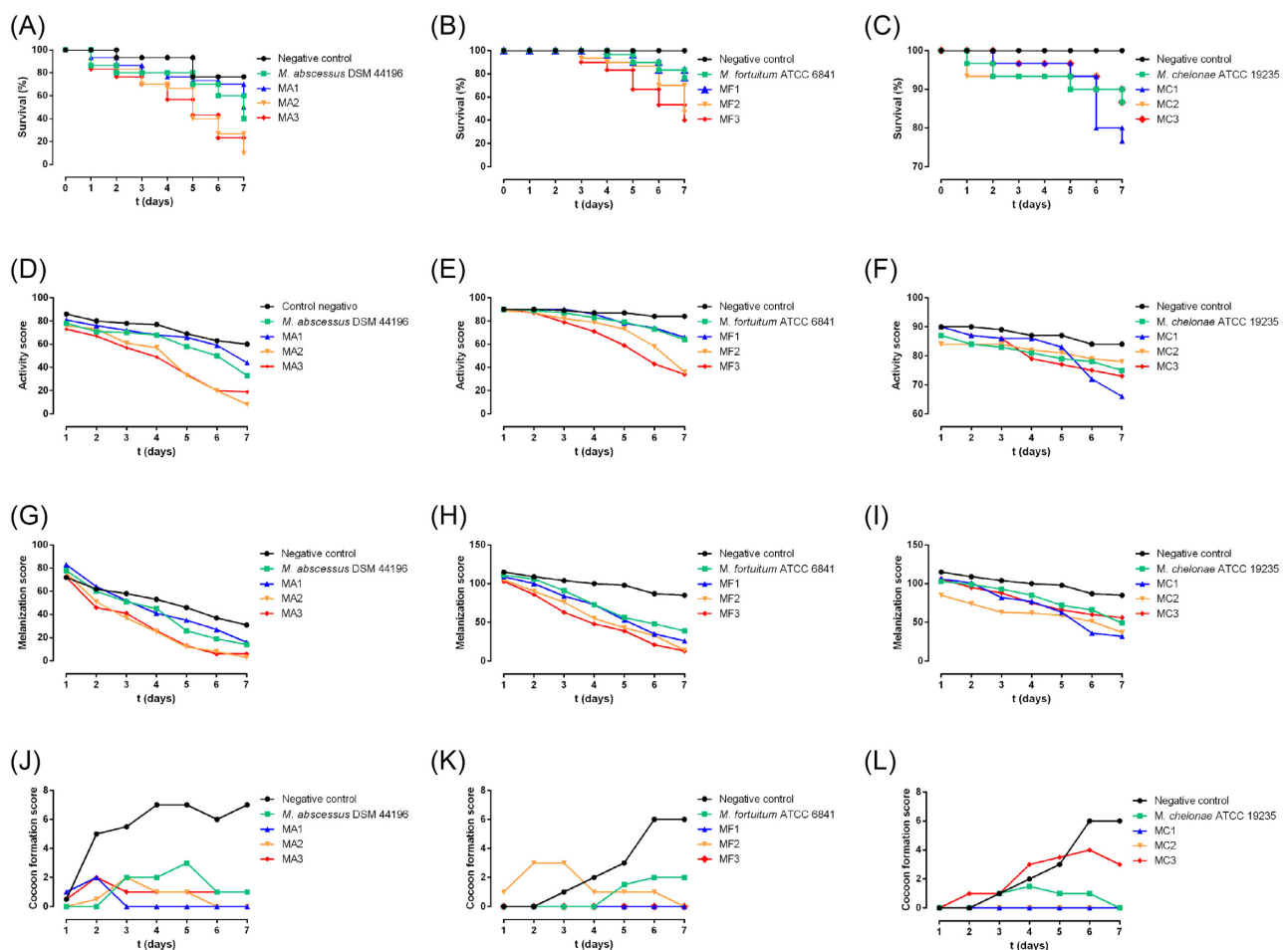


Figure 2. Percentage of survival of *G. mellonella* larvae infected with *M. abscessus* (A), *M. fortuitum* (B) and *M. chelonae* (C) strains. Activity score of *G. mellonella* larvae infected with *M. abscessus* (D), *M. fortuitum* (E) and *M. chelonae* (F). Melanization score of *G. mellonella* larvae infected with *M. abscessus* (G), *M. fortuitum* (H) and *M. chelonae* (I) strains. Cocoon formation score of *G. mellonella* larvae infected with *M. abscessus* (J), *M. fortuitum* (K) and *M. chelonae* (L) strains.

the activity score was significantly lower in infected groups compared to healthy ones ($P < 0.05$). In addition, these slopes were even lower in *G. mellonella* infected with RCV strains than in wax worms infected with SCV strains ($P < 0.05$) (Fig. 2D). In larvae infected with *M. fortuitum* the results were also similar, with the activity-score slopes significantly lower in groups infected with

RCV strains than in groups with SCV ($P < 0.05$) (Fig. 2E). *M. chelonae* did not follow this pattern (Fig. 2F).

For the melanization score, the control group showed a significantly lower production of dark skin coloration (the highest melanization score) when compared to the other groups ($P < 0.001$). *M. abscessus* melanization slopes score were lower in

the groups of larvae infected with RCV strains when compared with those infected with SCV strains, although the differences were only significant between *M. abscessus* DSM 44196 and MA2 ($P = 0.0468$), and between MA1 and MA2 ($P = 0.047$) (Fig. 2G). Likewise, *M. fortuitum* melanization score slopes were lower in larvae infected with RCV strains, but the differences were only significant between *M. fortuitum* ATCC 6841 and MF2 ($P < 0.001$) and between *M. fortuitum* ATCC 6841 and MF3 ($P < 0.001$) (Fig. 2H). On the other hand, *M. chelonae* slopes for melanization scores were different for each strain, as the lowest slope was found for the MC1 (smooth strain) and the highest for MC3 (rough strain) (Fig. 2I).

Cocoon formation score was higher in the control group than in the infected groups (Fig. 2J–L), but it was not possible to establish a relationship between this parameter and the colony phenotype, since rough or smooth colony variants did not show greater cocoon formation.

DISCUSSION

Although NPRGM are usually considered environmental opportunistic pathogens, *M. abscessus*, *M. chelonae* and *M. fortuitum* have been frequently associated with human disease, while other members of the group hardly cause human infections (Vaerewijck et al. 2005; Esteban et al. 2012). In addition, epidemiological evidence points to a potential role of risk factors in the ability of these organisms to produce human pathology (Wallace, Brown and Onyi 1992; Ingram et al. 1993; Benwill and Wallace 2014; Qvist et al. 2014). NPRGM's ability to form biofilms is an especially important pathogenic factor in human infections (Hall-Stoodley and Stoodley 2005). However, there are few studies concerning virulence factors associated with NPRGM and most of them focus on *M. abscessus* (i.e. the most pathogenic NPRGM species) (Petrini 2006). A study suggests that hemolysin production might influence pathogenesis and subsequent disease (Udou 1994). Another study has reported that *M. abscessus* contains a gene, absent in *M. chelonae*, that encodes phospholipase C (PLC), considered a key virulence factor, and purified recombinant *M. abscessus* PLC has been found to have a cytotoxic effect on mouse macrophages (Bakala N'Goma et al. 2015). Another potential factor determining *M. abscessus* virulence could be encoded by *mmpL4b* gene (i.e. critical for glycopeptidolipid synthesis); the deletion of this gene causes loss of motility and the ability to form biofilms, although mycobacterium increases its ability to replicate in human macrophages (Nessar et al. 2011). The complete genome sequence of *M. abscessus* shows that many virulence proteins are encoded by so-called mycobacterial genes, but many others have been acquired horizontally from environmental bacteria (e.g. actinobacteria or *Pseudomonas* spp.) (Ripoll et al. 2009).

Mycobacteria mostly infect and multiply in macrophages, and when macrophages phagocyte mycobacteria, they reside in phagosomes surrounded by a membrane within the cytoplasm. These bacteria have a great ability to adapt to intracellular environment (Edwards and Kirkpatrick 1986; Hirsch et al. 1994; McGarvey and Bermudez 2002). Phagocytosis and intracellular survival of mycobacteria have been studied as pathogenicity factors, using cellular models to evaluate different aspects of diseases and their possible treatment (Shepard 1957; Orme et al. 1994; Byrd and Lyons 1999; Roux et al. 2016). Byrd and Lyons reported that the rough phenotype of *M. abscessus* persists and multiplies in human monocytes, while the smooth variant underwent a decrease in this ability after 5 days

(Byrd and Lyons 1999). Roux et al. described a different performance of smooth and rough *M. abscessus* colony variants inside macrophages. Smooth colony variants are found as single bacteria within phagosomes, while rough-colony forms are located in phagosomes containing more than two bacilli; additionally, the smooth variants are able to restrict intraphagosomal acidification and induces less apoptosis (Roux et al. 2016). By contrast, Esteban et al. evaluated the NPRGM strains invasive capacity by means of a fibroblast microcolony assay, failing to find differences between different phenotypes (Esteban et al. 2006). In our study, we have demonstrated that phagocytosis is higher for the rough phenotype of *M. abscessus* and *M. fortuitum*, but no differences were found between rough and smooth variants of *M. chelonae*. It is known that the smooth colony phenotype of NPRGM is due to expression of GPL in the bacterial cell wall, and GPL is minimally expressed by rough variants. The study by Howard et al. showed that *M. abscessus* can switch between smooth and rough morphologies (Howard et al. 2006).

Regarding experimental models, the mouse model was the most widely used in order to evaluate pathogenicity and antimycobacterial agents (Orme et al. 1994; Doi 1998). Currently, these models are still used (Dong et al. 2017), but the use of mammals has been met with ethical and budgetary hurdles (Tsai, Loh and Proft 2016); therefore, alternative non-mammal models are being introduced. Zebrafish has been assayed with *M. marinum* (Chen et al. 2018), and larvae of *G. mellonella* have been successfully infected with *M. tuberculosis* (Li et al. 2018) and other non-tuberculous mycobacteria (Meir et al. 2018), including studies on the effect of antimicrobials on these organisms (Entwistle and Coote 2018). Use of *G. mellonella* does not require ethical approval, the larvae of this organism can survive at 37°C and their short life span makes them ideal for research (Tsai et al. 2016). The results of our *in vivo* study correlate well with the results of the cell model as well as other studies published for *M. abscessus* (Byrd and Lyons 1999; Roux et al. 2016). Larvae infected with the rough morphotype of *M. abscessus* and *M. fortuitum* had a lower survival rate than those infected with the smooth colony variant. Interestingly, no differences were observed in *M. chelonae* infection. In order to evaluate subtle differences in larvae health, activity, cocoon formation and melanization were also observed. Higher activity, cocoon formation and melanization scores corresponded to healthier wax worms. Activity and melanization scores were higher in groups of larvae infected by SCV which was correlated with a better survival rate. As seen for the survival rate, the activity and melanization parameters for the *M. chelonae* infection model did not follow a colony morphology pattern. Cocoon formation was not related to the different phenotypes of NPRGM colonies for any of the studied species.

ACKNOWLEDGMENTS

We want to acknowledge Mr Oliver Shaw for his help with the English language of the document.

FUNDING

The present work has been funded by a grant from the Instituto de Salud Carlos III (PI18/01068). JJAC is funded by an FPI grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BES-2014-069007).

Conflict of interest. None declared.

REFERENCES

- Arend SM, van Soolingen D, Ottenhoff TH. Diagnosis and treatment of lung infection with nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Pulm Med* 2009;15:201–8.
- Bakala N'Goma JC, Le Moigne V, Soismier N et al. Mycobacterium abscessus phospholipase C expression is induced during coculture within amoebae and enhances M. abscessus virulence in mice. *Infect Immun* 2015;83:780–91.
- Baltch AL, Bopp LH, Smith RP et al. Antibacterial activities of gemifloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and erythromycin against intracellular Legionella pneumophila and Legionella micdadei in human monocytes. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:104–9.
- Barrow WW, Brennan PJ. Isolation in high frequency of rough variants of Mycobacterium intracellulare lacking C-mycoside glycopeptidolipid antigens. *J Bacteriol* 1982;150:381–4.
- Belisle JT, Brennan PJ. Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. *J Bacteriol* 1989;171:3465–70.
- Benwill JL, Wallace RJ, Jr. Mycobacterium abscessus: challenges in diagnosis and treatment. *Curr Opin Infect Dis* 2014;27:506–10.
- Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 1995;64:29–63.
- Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:716–46.
- Byrd TF, Lyons CR. Preliminary characterization of a Mycobacterium abscessus mutant in human and murine models of infection. *Infect Immun* 1999;67:4700–7.
- Chen Z, Shao XY, Wang C et al. Mycobacterium marinum infection in zebrafish and microglia imitates the early stage of tuberculous meningitis. *J Mol Neurosci* 2018;64:321–30.
- Cho SY, Peck KR, Kim J et al. Mycobacterium chelonae infections associated with bee venom acupuncture. *Clin Infect Dis* 2014;58:e110–113.
- Collins FM, Cunningham DS. Systemic Mycobacterium kansasii infection and regulation of the alloantigenic response. *Infect Immun* 1981;32:614–24.
- De Groote MA, Huijt G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis* 2006;42:1756–63.
- Doi N. [Development of the intratracheal infection model of experimental murine mycobacteriosis: comparison with the intravenous infection model]. *Kekkaku* 1998;73:339–47.
- Dong H, Lv Y, Sreevatsan S et al. Differences in pathogenicity of three animal isolates of Mycobacterium species in a mouse model. *PLoS One* 2017;12:e0183666.
- Eckstein TM, Inamine JM, Lambert ML et al. A genetic mechanism for deletion of the ser2 gene cluster and formation of rough morphological variants of Mycobacterium avium. *J Bacteriol* 2000;182:6177–82.
- Edwards D, Kirkpatrick CH. The immunology of mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis* 1986;134:1062–71.
- El Helou G, Viola GM, Hachem R et al. Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections. *Lancet Infect Dis* 2013;13:166–74.
- Entwistle FM, Coote PJ. Evaluation of greater wax moth larvae, Galleria mellonella, as a novel in vivo model for non-tuberculosis Mycobacteria infections and antibiotic treatments. *J Med Microbiol* 2018;67:585–97.
- Esteban J, Gadea I, Zamora N et al. [Assessment of the invasiveness of rapidly-growing nonpigmented mycobacteria with the fibroblast microcolony assay]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006;24:551–5.
- Esteban J, Garcia-Coca M. Mycobacterium biofilms *Front Microbiol* 2017;8:2651.
- Esteban J, Garcia-Pedrazuela M, Munoz-Egea MC et al. Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis: an update. *Expert Opin Pharmacother* 2012;13:967–86.
- Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Fernandez AI et al. Epidemiology of infections due to nonpigmented rapidly growing mycobacteria diagnosed in an urban area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27:951–7.
- Falkinham III JO. The biology of environmental mycobacteria. *Environ Microbiol Rep* 2009;1:477–87.
- Floto RA, Olivier KN, Saiman L et al. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis: executive summary. *Thorax* 2016;71:88–90.
- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:367–416.
- Hakim A, Hisam N, Reuman PD. Environmental mycobacterial peritonitis complicating peritoneal dialysis: three cases and review. *Clin Infect Dis* 1993;16:426–31.
- Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol* 2005;13:7–10.
- Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Meth* 2001;44:121–9.
- Hirsch CS, Ellner JJ, Russell DG et al. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of Mycobacterium tuberculosis by human alveolar macrophages. *J Immunol* 1994;152:743–53.
- Howard ST, Byrd TF. The rapidly growing mycobacteria: saprophytes and parasites. *Microbes Infect* 2000;2:1845–53.
- Howard ST, Rhoades E, Recht J et al. Spontaneous reversion of Mycobacterium abscessus from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* 2006;152:1581–90.
- Ingram CW, Tanner DC, Durack DT et al. Disseminated infection with rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis* 1993;16:463–71.
- Lefebvre AL, Dubee V, Cortes M et al. Bactericidal and intracellular activity of beta-lactams against Mycobacterium abscessus. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:1556–63.
- Li Y, Spiropoulos J, Cooley W et al. Galleria mellonella—a novel infection model for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence* 2018;9:1126–37.
- Loh JM, Adenwalla N, Wiles S et al. Galleria mellonella larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence* 2013;4:419–28.
- McGarvey J, Bermudez LE. Pathogenesis of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Chest Med* 2002;23:569–83.
- Meir M, Grosfeld T, Barkan D. Establishment and validation of galleria mellonella as a novel model organism to study mycobacterium abscessus infection, pathogenesis, and treatment. *Antimicrob Agents Ch* 2018;62:e02539–17.
- Nessar R, Reytrat JM, Davidson LB et al. Deletion of the mmpL4b gene in the Mycobacterium abscessus glycopeptidolipid biosynthetic pathway results in loss of surface colonization capability, but enhanced ability to replicate in human macrophages and stimulate their innate immune response. *Microbiology* 2011;157:1187–95.

- Orme IM, Roberts AD, Furney SK et al. Animal and cell-culture models for the study of mycobacterial infections and treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;**13**:994–9.
- Petrini B. Mycobacterium abscessus: an emerging rapid-growing potential pathogen. *APMIS* 2006;**114**:319–28.
- Qvist T, Pressler T, Hoiby N et al. Shifting paradigms of nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *Respir Res* 2014;**15**:41.
- Recht J, Martinez A, Torello S et al. Genetic analysis of sliding motility in Mycobacterium smegmatis. *J Bacteriol* 2000;**182**:4348–51.
- Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C et al. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen Mycobacterium abscessus. *PLoS One* 2009;**4**:e5660.
- Roux AL, Viljoen A, Bah A et al. The distinct fate of smooth and rough Mycobacterium abscessus variants inside macrophages. *Open Biol* 2016;**6**:160185.
- Schaefer WB, Davis CL, Cohn ML. Pathogenicity of transparent, opaque, and rough variants of Mycobacterium avium in chickens and mice. *Am Rev Respir Dis* 1970;**102**:499–506.
- Shepard CC. Growth characteristics in HeLa cells of the rapidly growing acid fast bacteria, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium phlei, and Mycobacterium smegmatis. *J Bacteriol* 1957;**73**:722–6.
- Tsai CJ, Loh JM, Proft T. Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 2016;**7**:214–29.
- Udou T. Extracellular hemolytic activity in rapidly growing mycobacteria. *Can J Microbiol* 1994;**40**:318–21.
- Vaerewijck MJ, Huys G, Palomino JC et al. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev* 2005;**29**:911–34.
- van Ingen J, Boeree MJ, Dekhuijzen PN et al. Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. *Clin Microbiol Infect* 2009;**15**:888–93.
- Wallace RJ, Jr., Brown BA, Onyi GO. Skin, soft tissue, and bone infections due to Mycobacterium chelonae chelonae: importance of prior corticosteroid therapy, frequency of disseminated infections, and resistance to oral antimicrobials other than clarithromycin. *J Infect Dis* 1992;**166**:405–12.
- Yu JR, Heo ST, Lee KH et al. Skin and soft tissue infection due to rapidly growing mycobacteria: Case series and literature review. *Infect Chemother* 2013;**45**:85–93.